

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 02 MAR 2004	
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 46 614.2

Anmeldetag: 08. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber: alcedo biotech GmbH, 28359 Bremen/DE

Bezeichnung: Weitere Verwendung von HMG

IPC: A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

BEST AVAILABLE COPY

München, den 3. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

[Signature]

Faust

BOHMANN & LOOSEN

Anwaltssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.*¹

Rechtsanwalt
Peter Loosen, LL.M.²

Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

Zustelladresse:
Sonnenstr. 8
D-80331 München

Unser Zeichen
Our ref

A 10009

Ihr Zeichen
Your ref

Neuanmeldung
(Patent)

Datum
Date

München, 08. Oktober 2003

alcedo biotech GmbH, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen

Weitere Verwendung von HMG

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte für Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, und zur Wundheilung, Verfahren zur Angiogenese, Neovaskularisierung und transmyokardialen Revaskularisierung, Trägermaterial umfassend eine derartige Nukleinsäure, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukt sowie Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial sowie besagte Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte.

Das Blutgefäßsystem des Menschen besteht aus Arterien, Arteriolen, Blutkapillaren, Endstrombahnen, Venolen und Venen. Arterien sind Gefäße mit vom Herzen begleitender Strömungsrichtung des Bluts, wobei zwei Typen unterschieden werden: Arterien des muskulären Typs und Arterien des elastischen Typs, wobei letztere große herznahe Arterien darstellen. Arterien sind generell aufgebaut aus einer Tunica interna, die auch als Intima bezeichnet wird, mit einschichtigem, dem Lumen zugewandten Endothel, dem lockerem bindegewebigen Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna, die beim muskulären Typ deutlich

ausgeprägt ist, weiterhin der Tunica media, die beim muskulären Typ aus dichtgefügtten Lagen ring- oder schraubenförmig angeordneter glatter Muskelzellen und feinen elastischen und kollagenen Fasern besteht, beim elastischen Typ dagegen aus zahlreichen gefensterten elastischen Membranen und eingelagerten glatten Muskelzellen sowie Kollagenfasern und der Tunica externa, die aus kollagenem Bindegewebe und elastischen Fasern besteht und ernährende Gefäße sowie Gefäßnerven enthält. Zwischen der Tunica media und der Tunica externa kann eine Membrana elastica externa ausgebildet sein.

Als letzte Gefäßabschnitte der Arterien schließen sich Arteriolen an, die ein Endothel, ein Gitterfasernetz und eine einschichtige durchgehende glatte Muskelzellschicht besitzen, wobei die in Arterien noch vorhandene Membrana elastica interna fehlt, so dass myoendotheliale Kontakte entstehen.

Die Arteriolen gehen dann in Blutkapillaren über, kleine Gefäße mit einem Durchmesser von 6 bis ungefähr 20 bis 30 μm . Die Wand von Blutkapillargefäßen besteht aus einem Endothel, das einer von Gitterfasern umspannenden Basalmembran innen aufsitzt. Dieser Basalmembran liegen außen verzweigte Zellen, sogenannte Pericyten, an. Die Pericyten sind wahrscheinlich am Stoffaustausch zwischen dem Kapillarblut und dem Gewebe beteiligt.

Die Blutkapillaren gehen dann in Venolen und letztlich in Venen über, also Blutgefäße mit zum Herzen führender Strömungsrichtung des Blutes. Die Wand typischer Venen enthält eine Tunica interna mit vielen elastischen Fasern, jedoch keine Membrana elastica interna, weiterhin eine Tunica media mit lockergefügten Bündeln glatter Muskulatur sowie eine Tunica externa. Im Gegensatz zu Arterien erscheint die Begrenzung dieser Schichten im histologischen Präparat unscharf.

Der aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen bestehende, die Mikrozirkulation des Blutes bestimmende Abschnitt des Gefäßsystems wird Endstrombahn genannt und stellt in hämodynamischer Hinsicht den neutralen Bereich zwischen arteriellem Zufluss und venösem Abfluss des Blutes, also den Wendepunkt des Kreislaufs dar. In diesem Bereich finden Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gewebe sowie die Aufrechterhaltung des thermalen und Ionenmilieus statt.

Im Stand der Technik sind verschiedene Wachstumsfaktoren beschrieben, die im Rahmen der Angiogenese und/oder der aktiven Wundtherapie verwendet werden und die an einzelnen Zielmolekülen der Wundheilung angreifen. Dazu zählen, unter anderem, VEGF, transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF beta), von Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Interleukin 1 beta, Granulocyten-Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Gerinnungsfaktor XIII. Die in diese Verbindungen gesetzten Hoffnungen wurden jedoch oftmals nicht erfüllt, was zumindest zum Teil in der Komplexität des Wundheilungsprozesses begründet liegt.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, um Angiogenese oder Neovaskularisierung zu fördern oder zu inhibieren oder transmyokardiale Revaskularisierung zu fördern und die damit im Zusammenhang stehenden Erkrankungen behandelbar zu machen. In einem weiteren Aspekt liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Förderung bzw. Initiierung der Wundheilung bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch den Gegenstand der beigefügten unabhängigen Ansprüche gelöst, wobei sich besonders bevorzugte Ausführungsformen aus den Unteransprüchen ergeben.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis, dass insbesondere Angehörige der HMGA- und der HMGB-Familie Angiogenese- oder Neovaskularisierungsprozesse auslösen können. Dabei wird Angiogenese in einem Ausmaß angeregt, dass mit dem durch hochspezialisierte Angiogenesefaktoren wie VEGF bewirkten vergleichbar ist. Im Gegensatz zur Verwendung hochspezialisierter angiogenetischer Faktoren wie VEGF sind durch die Verwendung von HMG-Proteinen noch weitere Effekte zu erzielen, wie nachfolgend dargelegt wird.

Weiterhin liegt der vorliegenden Erfindung die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass aus der Gruppe der HMG-Proteine insbesondere HMGB1 sowie HMGA1 eine starke angiogene Wirkung zeigen und insoweit zur Behandlung von Erkrankungen, die mit Angiogenese im Zusammenhang stehen, wie hierin ausgeführt, verwendet werden können. Dieser Verwendung liegt die überraschende Beobachtung zugrunde, dass die angiogenen Effekte, abgeleitet aus

der Sprossenlänge von Blutgefäßen, überraschend groß sind. Diese Effekte sind im Gegensatz dazu bei einer HMGB1-induzierten Freisetzung von Cytokinen nicht zu erwarten.

Darüberhinaus haben die vorliegenden Erfinder überraschend festgestellt, dass nekrotische Zellen, insbesondere nekrotische Tumorzellen HMGB1 ausschütten, und im bestimmten Umfang auch HMGA-Proteine, und als extrazelluläre Liganden über den Rezeptor RAGE Endothelzellen zur Vaskular-/Angiogenese anregen. Aus diesem Mechanismus ergibt sich im übrigen, dass gegen HMG, insbesondere HMGB1 und HMGA, hier wiederum HMGA1, gescreepte Wirkstoffe besonders für jene Tumorerkrankungen verwendet werden können, die nekrotische Zellen umfassen bzw. nekrotische Tumorzellen umfassen bzw. die hierin beschriebenen Screening-Verfahren derartige Moleküle liefern werden bzw. zu liefern in der Lage sind.

Die Bildung neuer Blutgefäße ist bei einer Vielzahl von Vorgängen, beispielsweise bei der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Neovaskularisierung zur Behandlung von Hypoxien und Ischämie in myokardialen Gewebe von Bedeutung. Dabei werden zwei unterschiedliche Mechanismen unterschieden, die an diesen Vorgängen grundsätzlich beteiligt zu sein scheinen: einerseits die Vaskulogenese, d. h. die Gefäßneubildung aus sich in situ differenzierenden endothelialen Vorläuferzellen und andererseits die Angiogenese, d. h. die Neubildung von Gefäßen aus bestehenden Blutgefäßen. Die Endothelzellen ausgereifter Blutgefäße des erwachsenen Organismus befinden sich in einem ruhenden, nicht proliferativen Stadium. Erst durch einen bestimmten Stimulus, wie z. B. Entzündung, Trauma, Hypoxie oder Ischämie werden sie in die Lage versetzt, am Prozess der Angiogenese mitzuwirken bzw. den Prozess der Angiogenese zu stimulieren. Anschließend kommt es zu einer Kaskade verschiedener aufeinanderfolgender Prozesse, die unter anderen die Wanderung, Proliferation und erneute Verbindung von Endothelzellen beinhaltet. Als Ergebnis davon kommt es zur Bildung eines neuen, dreidimensionalen „Gefäßschlauches“. Bei der Angiogenese bzw. Neogenese von Gefäßen, die größer als Kapillaren sind, wandern zusätzlich Myozyten der glatten Gefäßwandmuskulatur ein, wodurch die Stabilität des neugebildeten Gefäßes gewährleistet wird.

Von der großen Anzahl der bei der Angiogenese beteiligten Wachstumsfaktoren und Cytokinen sind insbesondere die Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor (FGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als die entscheidenden zu bewerten. Sie sind als potente

mitogen wirksame Faktoren der Endothelzellen bekannt. Durch die Applikation von Wachstumsfaktoren bzw. Molekülen, welche wiederum stimulatorisch auf bestimmte Wachstumsfaktoren wirken, wird eine verbesserte Durchblutung des zu behandelnden Areals gewährleistet.

Eine klinisch wichtige Form der Angiogenese findet im Rahmen der sogenannten transmyokardialen Laser-Revaskularisation (TMLR) statt. Dabei werden durch Laserimpulse kleine Kanäle im Herzmuskel erzeugt. Vermutlich durch die traumatische Stimulierung des Herzmuskelgewebes in der Nähe der so erzeugten Kanäle kommt es in deren Umgebung zu Angiogenese, was letztlich zu einer verbesserten Durchblutung des Herzmuskels insbesondere im Bereich des ischämischen Gewebes führt. Transmyokardiale Revaskularisierung umfasst insbesondere Revaskularisierung nach Herzinfarkt, aber auch Revaskularisierung bei früheren Stadien von Herzkrankheiten wie Ischämie oder gefäßbedingter Herzinsuffizienz. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen die Begriffe Angiogenese, Vaskulogenese, Vaskularisierung, Neovaskularisierung und Revaskularisierung synonym verwendet werden, wobei in jedem Fall auf den auftretenden Effekt abgestellt wird, dass – unabhängig vom zugrundeliegenden molekularen oder zellulären Mechanismus – Blutgefäßbildung stattfindet.

Eine gezielte Beeinflussung von Angiogenese oder Neovaskularisierung im Sinne einer Förderung oder auch Inhibierung dieser Prozesse eröffnet die Möglichkeit, mit Angiogenese oder Neovaskularisierung im Zusammenhang stehende Krankheiten zu behandeln.

Dies betrifft beispielsweise Krankheiten, bei denen aufgrund unzureichender Blutversorgung ischämische Zustände vorliegen, beispielsweise bei Herzkranzgefäßverengung oder Arteriosklerose. In solchen Fällen könnte die Induktion neuer Blutgefäße durch Angiogenese oder Neovaskularisierung alternative Gefäße zur Versorgung mit Blut bereitstellen und somit zu einer Linderung der Krankheit beitragen. Weitere Beispiele für Krankheiten, die durch unzureichende Blutversorgung bedingt sind, sind Geschwüre, schlecht heilende oder chronische Wunden, Schwangerschaftsstörungen wie Gestose bis hin zur Unfruchtbarkeit.

In anderen Fällen können Krankheiten auf der übermäßigen Bildung von Blutgefäßen beruhen. Ein Beispiel hierfür ist die proliferative Retinopathia diabetica, bei der Gefäßneubildungen auf und vor der Netzhaut bis zur Erblindung führen können. Ein anderes Beispiel ist die

Bildung von Tumoren. Es ist inzwischen hinlänglich bekannt, dass erfolgreiches Tumorstadium eine ausreichende Versorgung der Krebszellen mit Nährstoffen erfordert, was wiederum eine ausreichende Versorgung des Tumorortes mit Blutgefäßen voraussetzt. Tumore, die nicht in der Lage sind, eine ausreichende Versorgung mit Blutgefäßen zu induzieren, sind deswegen in ihrem Wachstum begrenzt. Umgekehrt kann das Wachstum von Tumoren aktiv dadurch begrenzt werden, dass die Versorgung mit Blutgefäßen unterbunden wird. Gerade im Bereich der Haut wurden viele Arten von krebsartigen Erkrankungen mit übermäßiger Angiogenese in Verbindung gebracht, beispielsweise Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanome, Kaposi-Sarkom sowie aktinische Keratome als Krebsvorstufe. Prinzipiell kann aber jede Art von Krebs oder Tumor als mit übermäßiger Angiogenese einhergehend betrachtet werden. Weitere Beispiele für durch übermäßige Angiogenese bedingte Krankheiten sind Psoriasis sowie Arthritis.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sollen unter Krankheiten nicht nur Krankheiten oder Erkrankungen im klassischen Sinne wie beispielsweise Retinopathie, Psoriasis oder Tumore verstanden werden, sondern allgemein alle Zustände, deren Aufhebung im Sinne des Wohlbefindens eines Patienten wünschenswert ist. Dazu zählen insbesondere auch künstlich herbeigeführte Verletzungszustände, wie sie beispielsweise im Rahmen chirurgischer Eingriffe auftreten, beispielsweise OP-Wunden oder Wunden, die durch Einsetzung von Prothesen oder Implantaten entstehen.

Angiogenese tritt auch in einer kontrollierten, durch eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren koordinierten Weise im Zusammenhang mit Wundheilung auf, einem dynamischen Prozess mit komplexer Wechselwirkung zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Plasmaproteinen. Dabei kommt der Angiogenese die Aufgabe zu, Versorgungswege bereitzustellen, über die Zellen, Nährstoffe und andere Substanzen in das Wundgebiet transportiert werden können, wobei diese Versorgungswege nach abgeschlossenem Heilungsprozeß und gegebenenfalls zahlenmäßiger Reduktion zur Aufrechterhaltung der Versorgung des geheilten Gewebes bestehen bleiben können. Unabhängig von der Art der Wunde und dem Ausmaß des Gewebeverlustes lässt sich die Wundheilung grob in die sich zeitlich überlappenden Phasen der inflammatorischen bzw. exsudativen Phase, der proliferativen Phase sowie der Differenzierungs- und Umbauphase einteilen. Die Phaseneinteilung orientiert sich aber an den grund-

sätzlichen morphologischen Veränderungen im Laufe der Reparationsprozesse, ohne die eigentlich Komplexität der Vorgänge widerzuspiegeln.

Der Prozess der Wundheilung lässt sich quantitativ in eine primäre und sekundäre Wundheilung einteilen, wobei um der therapeutischen Problematik, die sich aus dem Umfang und der Art der Gewebeerstörung ergibt, Rechnung zu tragen, weiter in die verzögerte Primärheilung sowie den chronischen Wundverlauf unterschieden wird. Eine primäre Wundheilung ist zum Beispiel bei glatten, dicht aneinanderliegenden Wundflächen einer Schnittwunde ohne nennenswerten Substanzverlust und ohne Einlagerung von Fremdkörpern in einem gut mit Blutgefäßen versorgten Geweben der Fall. Eine primäre Wundheilung ist üblicherweise bei chirurgisch gesetzten Wunden oder bei Gelegenheitswunden durch scharfkantige Gegenstände gegeben. Ist aufgrund der Wundentstehung mit einer Infektion zu rechnen, tritt die verzögerte Primärheilung ein. Manifestiert sich eine Infektion, so wird die Wunde als sekundärheilend eingestuft. Eine Sekundärheilung ist bei größeren Defekten, bei denen ein Granulationsgewebe aufgebaut werden muss oder wenn eine Infektion die direkte Vereinigung der Wundränder nicht zulässt, gegeben. Ist die Heilung einer Wunde nicht innerhalb von acht Wochen abgeschlossen, so spricht man von einem chronischen Heilungsverlauf. Eine chronische Wunde kann in jeder Wundheilungsphase entstehen und entwickelt sich meistens aus fortschreitender Gewebeerstörung infolge von Gewebserkrankungen unterschiedlicher Genese, lokalen Druckschäden, Strahlenschäden oder Tumoren.

Eine weitere Unterscheidung der Wundheilung kann basieren auf der Unterscheidung in akute Wunden und chronische Wunden. Zu den akuten Wunden zählen die akuten traumatisch bedingten Wunden bis hin zu komplexen traumatischen Defekten, die thermischen und chemischen Verletzungen/Verbrennungen und Inzisionen/OP-Wunden.

Bei akuten traumatisch bedingten Wunden erfolgt für den Fall, dass sich die Wundränder spannungsfrei adaptieren lassen, gegebenenfalls nach erfolgter Wundexzision, ein primärer Wundverschluss durch Naht, Klammern oder Wundnahtstreifen. Bei Wunden, die eine potentielle Infektionsgefährdung aufweisen, wird die Wunde dagegen zunächst mit sterilen feuchten Verbänden offen gehalten, bis eine Infektion ausgeschlossen werden kann. Bei sekundär heilenden und komplexeren Wunden ist der Wundverschluss wesentlich vielschichtiger.

Bei thermischen und chemischen Wunden, d. h. solchen, die durch Einwirkung von Hitze und Kälte oder gewebeschädigenden Strahlen, Säuren oder Laugen entstehen, erfolgt die Behandlung entsprechend dem Schädigungsmuster. Bei schwer verbrannten Patienten erfolgt zum Beispiel zunächst eine Nekrektomie mit einem anschließenden chirurgischen Ersatz durch ein Hauttransplantat. Dabei werden für den Fall, dass die Wunde nicht transplantierbar ist oder durch die ausgedehnten Verbrennungen nicht mehr genügend Spenderstellen zur Verfügung stehen, sogenannte Allo- und Xenotransplantate verwendet. Bei ausreichend vorhandenen Spenderarealen kann auf permanente autologe Hauttransplantation zurückgegriffen werden. Eine Sonderform ist dabei die autologe Keratinocyten-Transplantation.

Chronische Wunden sind sekundär heilende Wunden, die trotz kausaler und sachgerechter lokaler Therapie innerhalb von acht Wochen nicht abheilen. Obgleich sich chronische Wunden jederzeit aus einer akuten Wunde entwickeln können, stellen die überwiegenden Fälle von chronischen Wunden das letzte Stadium einer fortschreitenden Gewebeerstörung dar, die ausgelöst wird durch venöse, arterielle oder stoffwechselbedingte Gefäßleiden, Druckschädigungen, Strahlenschäden oder Tumoren. Die verschiedenen Typen chronischer Wunden werden durch unterschiedliche Pathologien hervorgerufen, wobei die Wunden biochemisch betrachtet als ähnlich gelten. Zu den lokalen Faktoren, die die Wundheilung beeinträchtigen, zählen unter anderem Fremdkörper, Ischämie, wiederholte Traumata und Infektionen. Des Weiteren können systemische Faktoren wie beispielsweise erhöhtes Alter, Unter- und Fehlernährung, Diabetes sowie Nierenerkrankungen einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Zu den volkswirtschaftlich relevantesten chronischen Wundheilungsstörungen zählen, unter anderem, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, das diabetische Ulcus, das Dekubitalulcus und die chronische posttraumatische Wunde.

Die Behandlung der verschiedenen Wunden kann grundsätzlich in eine passive und eine aktive Wundtherapie eingeteilt werden. Als Sonderform können auch sog. Hautersatzverfahren verwendet werden. Bei der passiven Wundtherapie werden zum einen inaktive, textile Verbandstoffe verwendet, die als reines Abdeckungsmaterial dem Infektionsschutz dienen. Interaktive Wundauflagen dienen im Unterschied zu den inaktiven Verbandstoffen häufig dazu, ein feuchtes Wundmilieu zu schaffen und damit den Heilungsprozess zu beschleunigen. Dabei werden, unter anderem, Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere und Schaumverbände sowie Kalziumalginate verwendet. Der Nachteil dieser passiven Wundtherapie liegt

darin, dass das Verbandsmaterial die aktive Heilung von Problemwunden nicht befördert, insbesondere bei chronischen Wunden, die häufig als therapieresistent gelten.

Die vorliegende Erfindung basiert weiterhin auf der überraschenden Erkenntnis, dass HMG-Proteine, insbesondere HMGA-Proteine eine Zelle in einen Zustand zu versetzen können, der eine Entdifferenzierung, eine Differenzierung und/oder Um-Differenzierung oder eine Kombination der Vorgänge erlaubt. Konkret erfolgt unter dem Einfluss der besagten Proteine eine Entdifferenzierung oder Reprogrammierung einer Zelle, die sodann erlaubt, dass sich die Zelle ggf. in einen Zustand differenziert, der dem der Ausgangszelle oder dem einer anderen, d. h. von der Ausgangszelle verschiedenen Zelle entspricht. In einem jeden Fall werden die Zellen unter dem Einfluss der besagten Proteine in einen reaktivierten Zustand versetzt. Dieser den verschiedenen Anwendungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Mechanismus ist dabei in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die besagten Proteine als sog. Masterproteine eine Vielzahl von Genen kontrollieren und den funktionalen Zustand der Zelle bestimmen. Als Modulatoren von Transkriptionsfaktorkomplexen können sie grundsätzlich sowohl positiv als auch negativ auf die Expression ihrer Zielgene einwirken. Dazu binden sie mehr struktur- als sequenzspezifisch an die entsprechenden Promotoren und biegen die DNA, so dass entweder die Bindung der Transkriptionsfaktoren vermittelt wird oder die Transkriptionsfaktoren ihre Fähigkeit verlieren, in diesem Bereich mit der DNA zu assoziieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die besagten Proteine auch als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Weiterhin haben die vorliegenden Erfinder festgestellt, dass HMG-Proteine in der Embryonal- und Fetalentwicklung am Zell- und Gewebeaufbau beteiligt sind, während sie in den meisten differenzierten Zellen nach der Geburt nicht mehr nachweisbar sind. Während der frühen Embryogenese kann die mRNA einiger HMG-Proteine in nahezu allen Geweben detektiert werden. In der späteren Embryogenese ist die Expression auf mesenchymale Derivate und einige epitheliale Zellgewebe beschränkt.

Namensgebend für HMG-Proteine ist ihre hohe elektrophoretische Mobilität in Polyacrylamidgelen. Sie gehören zu den chromosomalen Nicht-Histon-Proteinen und sind primär nicht über ihre Proteinfunktion, sondern unter den Gesichtspunkten chemischer und physikalischer Eigenschaften definiert. Alle Mitglieder dieser Proteine sind aus Chromatin durch 0,35 M NaCl extrahierbar, sind in 2 bis 5 %iger Perchlorsäure löslich, weisen einen hohen Gehalt von geladenen Aminosäuren und ein Molekulargewicht von unter 30.000 Da auf. Die

HMG-Proteine werden unter Berücksichtigung von Sequenzhomologien und Sequenzmotiven in drei Subgruppen unterteilt, nämlich die HMGB (früher HMG-1/2)-Familie, die HMGN (früher HMG-14/17)-Familie und die HMGA (früher HMG-I/-Y/-C)-Familie.

Die Mitglieder der HMGN-Familie werden in allen höheren Eukaryonten exprimiert. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 10.000 und 20.000 Da. Sie sind die einzigen Nicht-Histon Proteine, die mit einer höheren Affinität mit ihrer positiv geladenen Nukleosomen-Bindungsdomäne (NBD), an den Nukleosomen-Kern als an Histon-freie DNA binden. Diese Bindungsdomäne umfaßt die Aminosäuren 12-41 des HMGN1 Proteins und die Aminosäuren 17-47 des HMGN2 Proteins und wurde auch in der Sequenz anderer Proteine gefunden; so enthält z. B. NBP45 ein NBD-Motiv in seiner primären Sequenz.

Die HMGA-Familie besteht aus drei Mitgliedern, nämlich HMGA1a und HMGA1b, die beide Splicevarianten eines Gens darstellen und dem verwandten, von einem anderen Gen codierten Protein HMGA2. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Proteine der HMGA-Familie liegt zwischen 10.000 und 12.000 Da. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie findet man zu meist nur in undifferenzierten embryonalen Zellen, in neoplastischen Zellen sowie in der exponentiellen Wachstumsphase differenzierter Zellen. Im Unterschied dazu sind sie in differenzierten Zellen des Normalgewebes nicht oder nur in geringen Konzentrationen nachweisbar.

Proteine dieser Familie besitzen jeweils 3 separate DNA-Bindungsdomänen, sowie eine saure Proteinbindungsdomäne. Die HMGA-Proteine binden an die kleine Furche AT-reicher DNA. Bei Genen, deren Promotor/Enhancer-Sequenzen in der Nähe solcher HMGA-Bindungsstellen lokalisiert sind, kann die Bindung von HMGA zu einer Beeinflussung der Transkription führen. So spielt die Acetylierung von HMGA1 eine entscheidene Rolle bei der Regulierung des Enhanceosomkomplexes zur Transkription des Interferon-Beta (IFN-beta)-Gens. Weitere posttranslationale Modifikationen der HMGA-Proteine sind die Phosphorylierung, welche abhängig vom Zellzyklus ist bzw. die ADP-Ribosylation.

Die Mitglieder der HMGB-Familie gehören zu den häufigsten HMG-Proteinen. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt maximal 25.000 Da.

HMGB-Proteine bestehen aus drei Domänen, wobei die zwei konservativen, stark sequenzzhomologen Domänen die unspezifische DNA-bindende Region der Proteine darstellen. Dieses funktionelle Motiv bezeichnet man als HMG-Box. HMGB-Proteine enthalten zwei dieser HMG-Boxen, nämlich Box A und B. Der C-terminale Bereich des HMGB1-Proteins bildet die Protein-bindende Domäne der HMGB-Proteine. Neben den HMGB-Proteinen gibt es eine große Anzahl anderer Proteine, bei denen sich HMG-Boxen nachweisen lassen. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören SRY, SOX-Proteine LEF1 und UBF1 (A. D. Baxevanis und D. Landsman: The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. NAR 23, 2002; 1604-1613). Die HMGB-Proteine stellen strukturelle Komponenten des Chromatins dar und sind an der transkriptionellen Regulation beteiligt.

Grundsätzlich sind alle HMG-Proteine, sowohl die derzeit bekannten als auch zukünftig noch aufzufindenden HMG-Proteine, im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar, insbesondere nach Durchführung der hierin beschriebenen Experimente, um im Einzelfall zu bestimmen, ob das konkrete HMG-Protein die entsprechenden erfindungsgemäßen Eigenschaften und damit das Verhalten in der jeweiligen Anwendung zeigt.

Derzeit sind ca. 15 HMG-Proteine bekannt. Besonders bevorzugt für die hierin beschriebenen Verwendungen und Anwendungen sind dabei die Proteine der HMGB-Familie, der HMGA-Familie oder die Proteine der HMGB-Familie in Kombination mit Proteinen der HMGA-Familie. Dabei soll es im Rahmen der vorliegenden Erfindung sein, dass die Proteine der genannten Familien nicht nur auf der Ebene der Translationsprodukte, sondern auch auf der Ebene der Transkriptionsprodukte oder der Gene bzw. codierenden Sequenzen verwendet werden können.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass aberante Transkripte der HMG-Proteine verwendet werden. Derartige trunkierte HMG-Proteine sind in der Literatur beschrieben, unter anderem auch in der internationalen Patentanmeldung WO 96/25493 oder WO 97/23611, deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

Bevorzugterweise weisen trunkierte HMG-Proteine, wie sie im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, die mindestens Exon 1, bevorzugterweise mindestens Exons 1 bis 3 des HMGA2-Gens sowie weitergehende Aminosäuren, die kodiert werden von

Sequenzen, die aus den Regionen unterschiedlicher chromosomaler Translokationspartner des Chromosomes 12 stammen, auf. Sowohl diese trunkierten Formen als auch weitere Abwandlungen der HMG-Proteine, wie z. B. HMGA2-LPP; HMGA2-RAD51L1 (beschrieben beispielsweise in Tkachenko, A et al., Cancer Res 997; 57 (11): 2276 - 80; Schoenmakers EF et al.; Cancer Res 1999 59(1): 19-23) HMGA1-LAMA4 (beschrieben beispielsweise in Schoenmakers EF et al. aaO; Tkachenko, A et al., aaO) und SP100-HMGB1, insbesondere HMGA1a, HMGA1b sowie HMGA2 können in Form von Derivaten vorliegen. Derartige Derivate können beispielsweise durch posttranslationale Modifikation, wie beispielsweise Acetylierung oder Phosphorylierung herstellbar sein, oder aber auch durch Konjugation an andere Moleküle modifiziert sein, wobei es im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist, dass bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Proteine diese unabhängig voneinander mit gleichen oder verschiedenen Modifikationen versehen sein können oder nicht alle gleichzeitig modifiziert sind. Derartige andere Moleküle können beispielsweise aus der Gruppe ausgewählt sein, die Zucker, Lipide, Peptide und kleine organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 umfasst.

Bevorzugte HMG-Proteine, die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind ein jedes einzelne der folgenden, in Tabelle 1 angegebenen Proteine, die mit den SEQ ID NOs. 1 bis 30 bezeichnet werden. Tabelle 1 gibt dabei einen Überblick unter Angabe der SEQ ID NOs., der Aminosäurelänge, der Zugangsnummer des Datenbankeintrages, sofern vorhanden, sowie des Aufbaus der Exonstruktur und daran angefügter, gegebenenfalls vorhandener zusätzlicher Aminosäuren.

Tabelle 1: Bevorzugte HMG-Proteine

SEQ ID NO.	Name des Proteins	Proteinlänge	Exon-Struktur	Zugansnr.
1	HMGA1a-Protein	107 Aminosäuren		X14957
2	HMGA1b-Protein	96 Aminosäuren		X14958
3	HMGA2-Protein	109 Aminosäuren		P52926
4	trunkiertes HMGA2	83 Aminosäuren	Exon 1-3	
5	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	90 Aminosäuren	Exon 1-3 + 7 Aminosäuren	U29113
6	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	96 Aminosäuren	Exon 1-3 + 13 Aminosäuren	U29117
7	HMGB1-Protein	215 Aminosäuren		S02826
8	trunkiertes HMGA2	147 Aminosäuren	Exon 1-3 + 64 Aminosäuren	U29119
9	trunkiertes HMGA2	106 Aminosäuren	Exon 1-3 + 23 Aminosäuren	U29112
10	trunkiertes HMGA2	92 Aminosäuren	Exon 1-3 + 9 Aminosäuren	H98218
11	trunkiertes HMGA2	96 Aminosäuren	Exon 1-4 + 2 Aminosäuren	U29120
12	trunkiertes HMGA2	118 Aminosäuren	Exon 1-4 + 24 Aminosäuren	U29115
13	trunkiertes HMGA2	95 Aminosäuren	Exon 1-4 + 1 Aminosäure	U29114
14	HMGA1a AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14957
15	HMGA1a AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 53-63	X14957

BOHMANN & LOOSEN

14

16	HMGA1a AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 78-89	X14957
17	HMGA1b AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14958
18	HMGA1b AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 42-52	X14958
19	HMGA1b AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 67-78	X14958
20	HMGA2 AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 1, Position im Protein AS 24-34	P52926
21	HMGA2 AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 2, Position im Protein AS 44-54	P52926
22	HMGA2 AT-Hook 3	21 Aminosäuren	Codiert von Exon 3, Position im Protein AS 71-91	P52926
23	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	78 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 6-83	S02826
24	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	71 AS (P09429)	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 9-79	P09429
25	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	73 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 +3, Position im Protein AS 6-78	NP_002119
26	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	75 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 - 5, Position im Protein AS 92-166	S02826
27	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	69 Aminosäuren	Exon 3 - 5, Position im Protein AS 95-163	P09429
28	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	49 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 + 4, Position im Protein AS 95-143	NP_002119

29	SP100-HMGB1	181 Aminosäuren	Alternatives Exon (HMGB1L3)	AF076675
30	HMGA2-LPP	225 Aminosäuren	Exon 1-3 + 142 Aminosäuren	

Die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendeten Nukleinsäuren sind dabei solche Nukleinsäuren bzw. deren Transkriptionsprodukte, die für die HMG-Proteine, wie sie hierin beschrieben sind, codieren und deren Derivate. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche Nukleinsäure umfasst ist, die für die vorstehend genannten HMG-Proteine codiert. Entsprechende Nukleinsäuren können durch die Degeneriertheit des genetischen Codes umfasst werden. Besonders bevorzugte Nukleinsäuren sind dabei jene, wie sie hierin mit den SEQ ID NOs. bezeichnet werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene, besonders bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die besagten Nukleinsäuren solche sind, die mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren bzw. ihren Transkriptionsprodukten und/oder deren Komplementärsträngen hybridisieren, insbesondere unter stringenten Hybridisierungsbedingungen. Derartige stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise solche, die in 0,1×SSC/0,1 % SDS bei 68°C (Perfect Hyb™ Plus (Hybridisierungspuffer der Firma Sigma)) oder in 5×SSC/50 % Formamid/0,02 % SDS/2 % Blocking Reagenz/0,1 % N-Lauroylsarcosin bei 42°C über Nacht durchgeführt werden.

Weiterhin umfasst sind solche Nukleinsäuren, die eine Identität von mindestens 65, bevorzugterweise 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 oder 99 % zu den besagten Nukleinsäuren aufweisen. Unter Transkriptionsprodukt wird hierin insbesondere auch die hnRNA oder mRNA bzw. cDNA der für HMG-Proteine codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, verstanden.

Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass von der Nukleinsäuresequenz von Genen von HMG-Proteinen abgeleitete inhibitorische Sequenzen wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder RNAi verwendet werden. Antisense-Nukleinsäuren, die in der Regel als Antisense-Oligonukleotide eingesetzt werden, weisen Basenkomplementarität mit einer Ziel-RNA, bevorzugterweise der mRNA eines zu exprimierenden Gens auf, und hybridisieren deswegen mit dieser Ziel-RNA, wodurch das Enzym RNase H aktiviert wird

und zu einem Abbau der Nukleinsäuren führt. Ribozyme sind katalytisch aktive Nukleinsäuren, die bevorzugterweise aus RNA bestehen und zwei Teilbereiche aufweisen. Dabei ist der erste Teilbereich für eine katalytische Aktivität verantwortlich, während der zweite Teil für eine spezifische Wechselwirkung mit einer Ziel-Nukleinsäure verantwortlich ist. Wenn es zur Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen der Ziel-Nukleinsäure und dem zweiten Teil der Ribozyme kommt, die typischerweise auf einer Hybridisierung von zueinander im wesentlichen komplementären Basenbereichen beruht, dann kann der katalytische Teil des Ribozyms entweder intramolekular oder intermolekular die Ziel-Nukleinsäure hydrolysieren, falls die katalytische Wirkung des Ribozyms eine Phosphodiesterase-Aktivität ist. Als Folge davon kommt es zu einem Abbau der codierenden Nukleinsäure und letztlich zu einer Verringerung der Expression des Zielmoleküls sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene. RNAi ist eine doppelsträngige RNA, die RNA-Interferenz vermittelt und typischerweise eine Länge von etwa 21 bis 23 Nukleotiden aufweist. Einer der beiden Stränge der RNA entspricht dabei der Sequenz eines abzubauenen Gens. Bei Einführung einer RNAi in einem Strang komplementär ist zu bevorzugterweise der mRNA eines Gens, kann die Expression dieses Gens somit verringert werden. Die Erzeugung und Verwendung von RNAi als Medikament bzw. diagnostisches Mittel ist beispielsweise beschrieben in den internationalen Patentanmeldungen WO 00/44895 und WO 01/75164.

Tabelle 2 Bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren

SEQ ID NO.	Name der Nukleinsäure	Anzahl der Basenpaare	Exon-Struktur	Zugansnr.
31	HMGA1a mRNA			M23614
32	HMGA1a Coding Sequence	324		M23614
33	HMGA1b mRNA			M23616
34	HMGA1b Coding Sequence	291		M23616
35	HMGA2 mRNA			NM_003483
36	HMGA2 Coding Sequence	330		NM_003483

37	trunkiertes HMGA2	252	Exons 1-3 + 3 bp STOP-Codon	
38	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	273	Exons 1-3 + 21 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29113
39	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	291	Exons 1-3 + 39 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29117
40	HMGB1 mRNA			NM_002128
41	HMGB1 Coding Sequence	648		NM_002128
42	trunkiertes HMGA2	444	Exon 1-3 + 192 bp + 3 bp STOP- Codon	U29119
43	trunkiertes HMGA2	321	Exon 1-3 + 69 bp + 3 bp STOP- Codon	U29112
44	trunkiertes HMGA2	279	Exon 1-3 + 27 bp + 3 bp STOP- Codon	H98218
45	trunkiertes HMGA2	291	Exon 1-4 + 6 bp + 3 bp STOP-Codon	U29120
46	trunkiertes HMGA2	357	Exon 1-4 + 72 bp + 3 bp STOP- Codon	U29115
47	trunkiertes HMGA2	288	Exon 1-4 + 3 bp + 3 bp STOP-Codon	U29114
48	HMGA1a AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23614
49	HMGA1a AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 157- 189 in CDS	M23614
50	HMGA1a AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 232- 267 in CDS	M23614
51	HMGA1b AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23616

BOHMANN & LOOSEN

18

52	HMGA1b AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 124-156 in CDS	M23616
53	HMGA1b AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 199-234 in CDS	M23616
54	HMGA2 AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 1, Position 70-102 in CDS	NM_003483
55	HMGA2 AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 2, Position 130-162 in CDS	NM_003483
56	HMGA2 AT-Hook 3	63	Codiert von Exon 3, Position 211-273 in CDS	NM_003483
57	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	234	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-249 in CDS	U51677
58	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	213	Codiert von Exon 2 + 3, Position 25-237 in CDS	P09429
59	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	219	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-234 in CDS	NM_002128
60	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	225	Codiert von Exon 3 - 5, Position 274-498 in CDS	U51677
61	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	207	Codiert von Exon 3 - 5, Position 283-489 in CDS	P09429
62	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	147	Codiert von Exon 3 + 4, Position 283-429 in CDS	NM_002128
63	SP100-HMGB1 mRNA	546		AF076675
64	HMGA2-LPP CDS	678	Exon 1 - 3 + 426 bp + 3 bp STOP-Codon	

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bevorzugterweise humane HMG-Proteine sowie die dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Infolge der Sequenzhomologie und des hohen Grades an Konservierung von HMG-Proteinen ist es jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass es sich bei den besagten Proteinen bzw. dafür codierenden Nukleinsäuren um solche handelt, die von anderen Organismen oder Arten als dem Menschen stammen. Dabei sind insbesondere jene von anderen Säugetieren bevorzugt und hiervon wiederum ganz besonders jene von Hund, Katze, Maus, Ratte, Pferd, Rind und Schwein. Weitere Quellen für die erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine sind solche von Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln. Besonders bevorzugt sind dabei Fische, insbesondere Salzwasserfische. Eine weitere bevorzugte Quelle sind Knorpel- und Knochenfische.

Die erfindungsgemäßen Anwendungen und Verwendungen der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für sie codierenden Nukleinsäure, einschließlich deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte, erstreckt sich dabei auf eine Vielzahl von Prozessen. Bevorzugterweise sind die Prozesse jene, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst. Die hierin beschriebenen HMG-Proteine und die für sie codierenden Nukleinsäuren weisen die Eigenschaft auf, einen oder mehrere der vorstehend genannten Prozesse zu initiieren, zu unterstützen, aufrecht zu erhalten und/oder fortzuführen, wobei es auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegt, die vorstehend genannten Prozesse durch auf der Grundlage der Nukleinsäuresequenzen von HMG-Genen erstellten Antisense-Molekülen, Ribozymen oder RNAi-Molekülen zu inhibieren. Die verschiedenen Prozesse können dabei gleichzeitig, aber auch zeitlich versetzt und gegebenenfalls überlappend unter Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren durchgeführt werden. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so, dass den vorstehend genannten Prozessen gemein ist, dass die Grundlagen hierfür in einer Aktivierung der an den verschiedenen Prozessen beteiligten Zellen begründet liegen. Grundsätzlich sind all jene Vorgänge mit den besagten Proteinen sowie der für sie codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, adressierbar im Sinne von initiiierbar, anregbar, unterstützbar, aufrechterhaltbar und/oder verstärkbar. Die erfindungsgemäße Anwendung und Verwendung der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für die besagten Proteine codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, erstreckt sich dabei auch auf jene Krankheiten, die mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Prozesse

kausal oder symptomatisch verbunden sind, bzw. für die Herstellung entsprechender Medikamente, pharmazeutischer Formulierungen oder kosmetischer Formulierungen. Weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist eine Verwendung der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der für sie codierenden Nukleinsäuren, einschließlich deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukten, in Kombination mit bekannten angiogenetischen Faktoren wie beispielsweise VEGF in den bzw. betreffend die verschiedenen Aspekte, insbesondere Anwendungsaspekte der vorliegenden Erfindung.

Die im Stand der Technik angeführten, zur Angiogenese, Neovaskularisierung oder Wundheilung verwendeten hochmolekularen Verbindungen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Cytokine, Gerinnungsfaktoren und dergleichen, greifen selektiv in das Geschehen der Angiogenese, Neovaskularisierung oder Wundheilung ein. Bei einer Verwendung der HMG-Proteine kann jedoch infolge des zentralen Wirkmechanismus der besagten Proteine sehr zu Beginn des Differenzierungszustandes eine ganzheitliche Regeneration des Gewebes bzw. der einzelnen Zellen realisiert werden. Die überraschend beobachtete Wirkung der besagten Proteine zu Zwecken der Angiogenese oder Neovaskularisierung oder noch darüber hinausgehend zur Wundheilung im weitesten Sinne, wie sie hierin definiert ist, beruht dabei auf den folgenden Abläufen bzw. Mechanismen, wobei darauf abgestellt werden kann, dass die besagten Proteine sowohl in der Stimulation der Angiogenese als isoliertem Prozess als auch in der proliferativen, der Differenzierungs- und Umbauphase des Wundheilungsprozesses, einschließlich Aufbauen des Granulationsgewebes, Stimulation der Angiogenese im Rahmen der Wundheilung sowie Proliferation und Migration von Epithelzellen, eingreifen und für diese Prozesse oder in Verfahren, die auf diesen Prozessen beruhen, verwendet werden können. Entsprechend ergibt sich eine Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren bei Krankheiten, die mit diesen Prozessen bzw. Phasen verbunden sind, einhergehen, darauf zurückgreifen und/oder auf diese kausal oder symptomatisch zurückgehen.

Eine wesentliche Ursache chronischer Wunden ist ein Ungleichgewicht zwischen Reparaturprozessen, die zur Bildung von neuem Gewebe führen und destruktiven Prozessen, die zur Entfernung des geschädigten Gewebes führen. Beispielsweise kann eine erhöhte Proteaseaktivität, zum Beispiel durch Überexpression von Matrixmetalloproteasen zu einer fehlgesteuerten Degradierung der extrazellulären Matrix führen. Durch die u. a. proliferationsfördernde Wirkung der HMG-Proteine kann das Ungleichgewicht zwischen der Synthese und Degradie-

nung der extrazellulären Matrix und daraus resultierende Verschiebung des Wundgleichgewichts in Richtung destruktiver Prozesse aufgehoben werden. Gegenüber dem Einsatz einzelner exogener Wachstumsfaktoren, die meistens eine spezifische Signalkaskade induzieren, besitzen die besagten Proteine den entscheidenden Vorteil, dass sie als architektonische Transkriptionsfaktoren eine ganze Reihe unterschiedlicher proliferationsfördernder Signaltransduktionswege ansprechen und somit ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen. Die besagten Proteine können durch die Synthese einer Reihe von funktionellen Proteinen in unterschiedlichen Zellen, wie zum Beispiel Keratinocyten, Fibroblasten und Endothelzellen, induzieren. Die besagten Proteine greifen darüber hinaus an einem späteren Punkt in die Signalkaskaden ein als die initial wirkenden exogenen Wachstumsfaktoren, die häufig vermutlich durch den hohen Proteasegehalt chronischer Wundflüssigkeit im Übrigen sehr schnell abgebaut werden.

Für den Heilungsprozess ist weiterhin eine ausreichende Durchblutung des Wundbereichs von essentieller Bedeutung. Ist dieser stark eingeschränkt, kann ein ausreichender Wundstoffwechsel nicht gewährleistet werden und dies zu einem chronischen Heilungsverlauf führen. Die HMG-Proteine fördern durch die Induktion der Proliferation von Endothelzellen auch die Angiogenese im Wundbett. Schließlich spielt bei Wundheilungsstörungen die Seneszenz von Zellen eine besondere Rolle. Ein zunehmendes Alter von dermalen Fibroblasten korreliert mit einem reduzierten Potential zur Proliferation. Fibroblasten in chronischen Wunden weisen eine verschlechterte Reaktion auf Wachstumsfaktoren auf, die vermutlich auf eine steigende Anzahl an seneszenten Zellen zurückzuführen ist. Die besagten Proteine besitzen die Fähigkeit, diese Zellen durch ihre reprogrammierende oder „verjüngende“ Eigenschaften wieder in einen aktiven Zustand zu versetzen und ihre Proliferation zu reaktivieren.

Schließlich stellt eine stark eingeschränkte Epithelisierung eine weitere Störung im Heilungsprozess von chronischen Wunden dar, wodurch die Heilung nicht zum Abschluss gebracht werden kann. Ein Faktor ist dabei die eingeschränkte Migration von Epithelzellen am unmittelbaren Ulcusrand. Die vorliegenden Erfinder haben gezeigt, dass HMG-Proteine die Mobilität von Zellen erhöhen können, so dass auch im Hinblick auf die Migration von Epithelzellen eine positive Wirkung durch die HMG-Proteine auftritt.

Mit Hinblick das komplexe Zusammenspiel der oben beschriebenen Faktoren der Durchblutung, des Alters von im Wundbereich befindlichen Fibroblasten und der Epithelisierung der Wunde ist in einem Aspekt der Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGA-Familie zusammen mit Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGB-Familie vorgesehen. Ohne durch die Theorie festgelegt sein zu wollen, gehen die vorliegenden Erfinder davon aus, dass Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGA-Familie, einer im wesentlichen embryonal exprimierten Proteinfamilie, eine Entdifferenzierung oder „Verjüngung“ von Zellen und Geweben bewirken, die letztendlich auch das Proliferationspotential von Fibroblasten und die Migration von Epithelzellen erhöht. Nukleinsäuren, Transkriptions- oder Translationsprodukten von Proteinen der HMGB-Familie, insbesondere von HMGB1, lösen im wesentlichen eine Signalkette aus, die zur Angiogenese oder Neovaskularisierung führt. Diese unterschiedlichen Wirkungen von Angehörigen der HMGA-Familie und der HMGB-Familie führen zu einem synergistischen Effekt hinsichtlich Angiogenese oder Neovaskularisierung und Wundheilung.

Bevorzugte Erkrankungen bzw. Krankheiten, zu deren Therapie und/oder Prävention die hierin beschriebenen HMG-Proteine sowie die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, verwendet werden können bzw. die für die hierin offenbarten Medikamente oder pharmazeutischen Formulierungen verwendbar sind, sind insbesondere die folgenden: diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Psoriasis, Rosacea, Besenreizevarizen, eruptives Hämangiom, kavernoöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Arteriosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, primäre und sekundäre Wundheilung, gestörte primäre und sekundäre Wundheilung, chronische Wundheilung, akute Wunden und chronische Wunden, traumatisch bedingte Wunden, komplexe traumatische Defekte, thermische Verletzungen, thermische Verbrennungen, chemische Verletzungen, chemische Verbrennungen, Inzisionen, OP-Wunden, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischer Ulcus, Dekubitalulcus, chronisch posttraumatische Wunden, Hautkrebs sowie diese Erkrankungen bei besonderen Patientengruppen, wobei die Patientengruppen insbesondere ältere Personen, Personen mit Unterernährung, Personen mit Fehlernährung, Personen mit Diabetes,

Personen die einer Strahlentherapie unterzogen werden oder wurden und/oder Personen mit Nierenerkrankungen sind.

Bei der Angiogenese oder Neovaskularisierung ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese sich auf Gewebe oder Organe beziehen, die beispielsweise durch Explantation bereitgestellt werden. So können beispielsweise zur Implantation vorgesehene Gewebe oder Organe unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren zur Angiogenese oder Neovaskularisierung angeregt werden. Nach der Implantation haben solchermaßen behandelte Gewebe oder Organe höhere Chancen, aufgrund der bereits induzierten Angiogenese oder Neovaskularisierung in den Empfängerorganismus einzuwachsen und Zell- oder Gewebeschäden, die während der Explantationsphase entstanden sein können, zu begrenzen oder zu heilen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es auch vorgesehen, dass in vitro-gezüchtete Gewebe oder Organe zur Angiogenese oder Neovaskularisierung angeregt werden.

Bei der Wundheilung spielen der angiogenetische bzw. neovaskularisierende Effekt, der proliferationsfördernde Effekt der HMG-Proteine, wie bereits vorstehend erwähnt, sowie eine Beschleunigung des Wundheilungsprozesses eine große Rolle. Von besonderem Vorteil ist bei Verwendung der besagten Proteine, die Art der Narbenbildung. Bei fetaler Wundheilung erfolgt eine ausgesprochen schnelle Wundheilung ohne Narbenbildung verglichen mit der postnatalen Heilung. Mit Blick darauf, dass unter Verwendung der besagten Proteine, insbesondere bei einer Kombination von Proteinen aus der HMGB- und aus der HMGA-Familie, eine aktive Wundheilung erfolgt, die den Prozess der fetalen Wundheilung widerspiegelt, tritt bei der erfindungsgemäßen Verwendung der besagten Proteine ein schneller und narbenfreier Wundverschluss auf. Ein wichtiger Aspekt bei einem jeden der Prozesse, bei denen die besagten Proteine erfindungsgemäß verwendet werden, ist dabei die Tatsache, dass das Risiko für Hautirritationen sowie allergische Reaktionen als äußerst gering eingestuft werden kann, da es sich bei den HMG-Proteinen um natürliche, körpereigene Substanzen handelt. Darüber hinaus sind die besagten Proteine von Mensch und Tier durch eine hohe Konservierung nahezu identisch, so dass die Resultate aus *in vivo*-Experimenten am Versuchstier eine hohe Übertragbarkeit am Menschen aufweisen. Es ist auch im Rahmen der Wundheilung, dass unter erfindungsgemäßer Anwendung der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren die Transplantation eines Hautersatzes möglich wird, wobei es sich bei dem Hautersatz um einen solchen handelt, der ausgehend von autologen Hautzellen und ggf. deren Vermeh-

rung erzeugt wird unter Verwendung der besagten Proteine als *in vitro*-Stimulationsfaktoren. Die hierzu erforderlichen autologen Hautzellen können beispielsweise aus Biopsien stammen. Typische Anwendungen sind dabei großflächige Verbrennungen oder Therapie-resistente chronische Ulzera. Auch hier, wie bei allen autologen Hautersatzverfahren, ist besonders vorteilhaft, dass keine Abstoßungsreaktion des Immunsystems hervorgerufen wird.

Mit der vorstehend beschriebenen komplexen Wirkungsweise der erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren im Sinne der Gewährleistung einer ausreichenden Durchblutung des Wundbereiches erklärt sich auch deren Verwendung bei der Vaskularisierung bei Herzinfarkt. Unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine kommt es zur Induktion der Proliferation von Endothelzellen, die die Angiogenese im Wundbett fördern und insoweit eine Versorgung des Herzmuskels mit Blutgefäßen gewährleisten. Gleiches gilt auch für die Anwendung im Rahmen der Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten. Dabei kommen auch die proliferationsfördernde Wirkung der erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren einschließlich des Angiogenese-Effektes, wie er vorstehend beschrieben wurde, zum Tragen. Schließlich kommt insbesondere bei diesem Anwendungsaspekt die Wirkung zum Tragen, dass unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten HMG-bindenden Proteine die Zellen in ihrer Motilität erhöht werden, so dass ein Um- und Einwachsen von Zahn- und Knochenimplantaten besonders gefördert wird.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass anstelle der HMG-Proteine auch Nukleinsäuren, wie vorstehend beschrieben, die für diese codieren, in die jeweilige Zelle bzw. in das Gewebe eingeführt werden. Die solchermaßen behandelten Nukleinsäuren sind bevorzugterweise in einen Expressionsvektor eingebracht, der die Expression der Nukleinsäure in der jeweiligen Zelle bzw. dem von dieser mit aufgebautem Gewebe erlaubt, so dass intrazellulär die entsprechenden HMG-Proteine exprimiert werden. Die entsprechenden Expressionsvektoren für die jeweiligen Zellen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 bzw. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Geeignete virale Vektoren zur Expression von Genen leiten sich bspw. aus inaktivierten Viren ab, wie bspw. Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Epstein-Barr-Viren, Herpes-Simplex-Viren,

Papilloma-Viren, Polyoma-Viren, Retroviren, SV40 und Vaccinia-Viren. Geeignete Plasmid-Vektoren sind typischerweise aus prokaryotischen, eukaryotischen und/oder viralen Sequenzen zusammengesetzt. Beispiele hierfür sind insbesondere pTK2, pHyg, pRSVneo, pACT, pCAT, pCAT-basierte, pCI, pSI, pCR2.1, pCR2.1-basierte, pDEST, und pDEST-basierte. Den Fachleuten auf diesem Gebiet sind ebenfalls Verfahren bekannt, um die jeweilige DNA in die besagten Zellen bzw. Gewebe einzuführen, sei es dass die Einführung *in situ*, *in vivo* oder *in vitro* erfolgt. Zu den entsprechenden Verfahren gehören, unter anderem, PO₄-Präzipitation (CaPO₄, BES-CaPO₄, SRPO₄), kationische Polymere, Liposome, Molekulare Konjugate (z. B. Polylysin), Gramacidin S-DNA-Lipid Komplexe, Elektroporation, biolistische Genkanone (engl. „biolistic gene gun“), Mikroinjektion, rekombinante Viren und nackte DNA, wie beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 sowie Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Es ist somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung der HMG-Proteine, wie hierin beschrieben, ersetzt werden kann durch eine dafür codierende Nukleinsäure, die zur Expression der besagten HMG-Proteine in einem Expressionssystem führen. Geeignete Expressionssysteme sind, u. a., Zellaufschlüsse, Zellen, Gewebe und/oder Organe.

Im erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere *in vitro*-Verfahren, zur Angiogenese oder Neovaskularisierung von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en) und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en),

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für HMG-Proteine umfasst,

können die hierin beschriebenen HMG-Proteine bzw. entsprechende Nukleinsäuren verwendet werden.

Die Bereitstellung eines Gewebes kann dabei beispielsweise durch Biopsie oder Explantation erfolgen.

Das Inkubieren des Gewebes mit einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wie hierin beschrieben bzw. definiert, zu dem Gewebe oder einem Teil davon kann dabei so vorgenommen werden, dass eine Aufnahme des Translationsproduktes bzw. der Nukleinsäure oder deren Transkriptionsprodukt in eine oder mehrere Zellen des Gewebes erfolgt. Bevorzugterweise wird die Nukleinsäure hierzu in einer Form bereitgestellt, die eine Transfizierung einer oder mehrerer Zellen des Gewebes erlaubt. Geeignete Maßnahmen hierzu sind beispielsweise das Zugabe der Nukleinsäure bzw. deren Transkriptionsprodukt in Form eines bzw. das Inkubieren mit Hilfe eines Liposoms oder einer anderen Form, welche die Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren erlaubt. Die Translationsprodukte, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteine können im Rahmen der Inkubation in die Zelle eingeführt werden unter Anwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren, so beispielsweise durch Elektroporation, Behandlung der Zellmembran mittels eines Bakteriotoxins, wie beispielsweise Streptolysin O oder Protein-Transduktions-Domänen und Peptid-Carrier.

Die Elektroporation, bei der mit einem kurzen elektrischen Stromstoß (Puls) reversible Öffnungen (Poren) in einer Membran erzeugt werden können, wurde in den 70er Jahren erstmalig zum Einbringen von Xenomolekülen in Zellen genutzt. Durch die entstandenen Membranporen können sowohl niedermolekulare Substanzen (z. B. Farbstoffe und Peptide) als auch hochmolekulare Stoffe (z. B. Proteine, DNA und RNA) in Bakterienzellen sowie eukaryotischen Zellen eingeschleust werden. Da diese Methode jedoch im Verhältnis zu anderen Methoden eine relativ geringe Transporteffizienz aufweist, wird man im Rahmen bevorzugterweise einer klinischen Anwendung bevorzugterweise auf die im Folgenden beschriebenen Methoden und Agenzien zurückgreifen.

Membranen eukaryotischer Zellen lassen sich mittels eines Bakterientoxins, wie z. B. Streptolysin O permeabilisieren. Der Transfer von HMG-Proteinen in eukaryotische Zellen mit Hilfe von Streptolysin O (SLO) erfolgt durch Variationen in der Ca^{2+} -Konzentration: in Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen erfolgt die Lyse der Zellen und durch die nachfolgende Zugabe von Ca^{2+} -Ionen können die Zellenporen wieder verschlossen werden. Um eine Reversibilität des Lysevorganges zu gewährleisten, wird die optimale SLO-Konzentration für jeden Zelltyp im Rahmen von den Fachleuten auf dem Gebiet bekannten Routineversuchen spezifisch ermittelt. Mit Hilfe dieser Methode werden die hierin offenbarten Wirkstoffe, d. h. die HMG-Proteine und die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, in beispielsweise Hautzellen geschleust, um z. B. das Wachstum von *in vitro* kultivierten autologen Keratinozyten zu stimulieren. Hochproliferative Zellen können auf diese Weise Patienten mit chronischen Wunden bzw. Verbrennungspatienten als Transplantat zur Verfügung gestellt werden.

Liposomen wurden erstmals 1961 für Studien zum Ionentransport durch die Zellmembran eingesetzt und wurde später als ein nützliches Transportmittel für Medikamentenwirkstoffe entdeckt. Während jedoch die systemische Anwendung von in Liposomen eingekapselten Medikamenten bislang nur wenige Erfolge brachte, eröffnet die topische Applikation von Liposomen in der Dermatologie neue Chancen. Darüber hinaus werden inzwischen auch Kosmetika auf Liposomenbasis in den vereinigten Staaten und Westeuropa vermarktet. Insofern stellen Liposomen besonders bevorzugte Applikationsformen für die Verabreichung der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren dar, insbesondere im Falle der hierin beschriebenen Herstellung von Medikamenten und Produkten zur äußerlichen Auftragung.

Liposomen sind Mycellen, die in ihrem Aufbau der Doppellipidschicht der Zellmembran gleichen und somit, wenn man sie im Überschuss zugibt, mit den Zellen verschmelzen. Vorher in die hydrophile Phase der Liposomen eingebrachte bzw. verkapselte Wirkstoffe können daher in der Zelle freigegeben werden. Die Klassifikation von Liposomen basiert auf ihrer Größe und auf der Anzahl der Lipiddoppelschichten. Es gibt große Vesikel (von 0,1 bis $>10 \mu\text{m}$) mit mehreren Lipiddoppelschichten (multilammellar large vesicles = MLV), große Vesikel ($\geq 0,06 \mu\text{m}$) mit einer Lipiddoppelschicht (large unilamellar vesicles) und kleine Vesikel (0,02 - $0,05 \mu\text{m}$) mit einer Lipiddoppelschicht (small unilamellar vesicles). Über die Anzahl der Lipiddoppellayer kann bis zu einem gewissen Grad die quantitative Freilassung oder Freiset-

zung des Wirkstoffes in der Zelle gesteuert werden. Desweiteren kann über den Einbau von z. B. Ceramiden anstelle der Phospholipidkomponenten, d. h. Strukturen, die denen der Membranstrukturen von Keratinozyten ähneln, die Kompatibilität zwischen Liposomen und der Haut erhöht werden. Diese Methode eignet sich daher besonders für ein topisch zu applizierendes Präparat mit einem Wirkstoff auf der Basis der hierin beschriebenen HMG-Proteine und der dafür codierenden Nukleinsäuren. Aufgrund der geringen Größe der HMG-Proteine, insbesondere der HMGA-Proteine (<12 kDa), eignen sich diese darüber hinaus besonders gut für eine Verpackung in Liposomen.

Protein Transduktions Domänen (PTD) und Peptid-Carrier stellen eine effiziente Möglichkeit dar, um die erfindungsgemäß verwendeten Proteine in Zellen zu schleusen. PTDs sind im Allgemeinen kurze Peptide von 10 - 16 Aminosäuren (meist positiv geladene Lysin und Argininreste), die kovalent mit dem zu transportierenden Protein verbunden sind. Die PTD-vermittelte Transduktion erfolgt über einen bislang wenig bekannten Mechanismus, der unabhängig von Rezeptoren, Transportern und der Endocytose ist. Mit Hilfe der PTDs konnten bereits Proteine mit einer Größe von bis zu 700 kDa in Zellen geschleust werden. Desweiteren sind die PTDs insbesondere für den Transport von Medikamentenwirkstoffen wie den erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteinen und den sie codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, geeignet, da bereits die *in vivo*-Transduktion von Proteinen in Geweben und Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch die kovalente Bindung der PTDs an die zu übertragenden Proteine ist diese Technologie jedoch hinsichtlich einer vollständig zu erhaltenden Funktionalität des zu transportierenden Wirkstoffes bedingt limitiert. Bevorzugterweise wird auch deshalb in bevorzugten Ausführungsformen auf nicht-kovalente Peptid Carrier zurückgegriffen, wie z. B. dem Chariot Reagenz (Carlsbad). Dieses Protein Transport System beruht auf einem kurzen synthetischen Signalpeptid (Pep-1), das sich mit dem zu transportierenden Protein über nichtkovalente hydrophobe Interaktionen komplexiert. Innerhalb der Zelle dissoziiert das transportierte Protein von dem Pep1-Peptid und wird durch zelluläre Transportmechanismen weiter zu der vorhergesehenen intrazellulären Lokalisation transportiert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Effizienz des Transportes von – je nach Zelltyp und Protein – 60 - 95 %. Diese Methode eignet sich damit sowohl für den Einsatz im Rahmen der durch die HMG-Proteine vermittelten Proliferationsförderung bei *in vitro* kultivierten autologen Haut-Zellen als auch im Rahmen eines topisch zu applizierenden entsprechenden Präparates mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Wirkstoffen.

Die Inkubation des Gewebes mit der Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt erfolgt dabei unter Bedingungen, die eine Aufnahme derselben in die Zelle bzw. das Gewebe erlaubt. Bevorzugterweise erfolgt die Inkubation bei 37°C unter physiologischen Bedingungen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung, welche eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wie hierin beschrieben und einen pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst. Eine pharmazeutische Formulierung kann dabei eine solche sein, die für die verschiedenen Formen der Applikation ausgebildet ist. Derartige Applikationsformen schließen insbesondere die topische Applikation und die subkutane Applikation ein. Gleiches gilt für die kosmetische Formulierung gemäß der vorliegenden Erfindung. Als geeignete pharmazeutische Träger oder auch kosmetische Träger, wie beispielsweise in der Verordnung über kosmetische Mittel vom 19. Juni 1995 für die Bundesrepublik Deutschland geregelt, können die folgenden einzelnen oder in beliebiger Kombination verwendet werden: Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika, Alkohole, Basen, Säuren, Stärke, Feuchthaltemittel, Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Formulierungen können dabei neben den erfindungsgemäß verwendeten HMG-Proteinen bzw. der/den dafür codierenden Nukleinsäure(n) oder den von der Nukleinsäuresequenz der HMG-Proteine abgeleiteten inhibitorisch wirkenden Nukleinsäuren wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozyme oder RNAi noch weitere Wirkstoffe enthalten. Pharmazeutische oder kosmetische Formulierungen, die mindestens ein HMG-Protein bzw. eine dafür codierende Nukleinsäure enthalten, sind insbesondere Salben, Cremes und Gele.

Der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass die HMG-Proteine, einen spontanen Transfer in tierische Zellen, insbesondere Epithelzelle und ganz besonders bevorzugt in menschliche Epithelzellen zeigen. Infolge dessen ist es möglich,

die besagten Proteine direkt auf eine mit Zellen bedeckte Oberfläche, insbesondere auf die zu behandelnden Zellen, aufzutragen, die sodann die besagten Proteine spontan aufnehmen. Bevorzugterweise befinden sich dabei die Proteine in einem Trägermedium, welches diesen spontanen Transfer fördert. Derartige Transfermedien sind beispielsweise wässrige oder alkoholische Lösungen oder geeignete Emulsionen oder andere Phasen oder Phasengemische. Dieses überraschende Verhalten der HMG-Proteine erlaubt deren direkte Verwendung in pharmazeutischen und/oder kosmetischen Formulierungen, wobei keine besonderen weiteren Maßnahmen, wie beispielsweise die Verwendung von Streptolysin zur Aufnahme der Proteine in die zu behandelnde Zelle, erforderlich sind.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en) oder damit erstellten pharmazeutischen Formulierungen können jegliche im Stand der Technik bekannte Applikationsmethoden eingesetzt werden. Beispielsweise kann über Injektionsspritzen eine intradermale, subkutane intramuskuläre oder intravenöse bzw. intraarterielle Applikation vorgenommen werden, bzw. eine Applikation kann direkt in das Zielgewebe erfolgen. Ebenfalls verwendet werden können Kathetersonden oder eine direkte Auftragung eines freigelegten Zielgewebes. Die jeweils verwendete Applikationsmethode wird sich normalerweise nach dem Zielgewebe richten. Soll beispielsweise eine Revaskularisierung von Herzmuskelgewebe erreicht werden, wird eine Applizierung einer erfindungsgemäßen Formulierung über Katheter, Kanülen oder ein Kombinationsinstrument bevorzugt sein, das beispielsweise im Rahmen der TMLR auch die Verabreichung von Laserstrahlen ermöglicht. Soll beispielsweise Hautgewebe erreicht werden, beispielsweise zur Förderung der Angiogenese beispielsweise im Sinne einer Verbesserung von Wundheilung durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren deren Transkriptions- oder Translationsprodukte bzw. zur Inhibierung von Angiogenese beispielsweise im Falle von Hämangiomen oder Besenreisvarizen durch von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren abgeleiteten inhibitorischen Molekülen wie Antisense-Nukleinsäuren, Ribozymen oder RNAi oder im Rahmen von Screening-Verfahren gefundenen inhibitorischen Substanzen, dann kann beispielsweise eine intradermale oder subkutane Verabreichung oder auch eine topische Auftragung in Form von Cremes angezeigt sein. Es liegt innerhalb des Könnens des Fachmanns, geeignete Verabreichungsmethoden auszuwählen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Zellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind sowie Gewebe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Trägermaterial, welches eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) umfasst, wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) solche, wie sie hierin beschrieben sind, darstellen können. Das Trägermaterial wird insbesondere als Implantat oder als Abdeckmaterial, bevorzugt zur Wundheilung aber auch für eine jegliche andere der hierin beschriebenen Erkrankungen oder Zustände, verwendet. Grundsätzlich sind jegliche Materialien hierzu verwendbar, die für Implantatmaterialien oder als Abdeckmittel bzw. Trägermaterial für die Wundheilung oder die anderen, hierin beschriebenen Anwendungen, die mit der Bereitstellung einer Oberfläche, an bzw. auf der die HMG-Proteine, wie sie hierin beschrieben sind, kovalent oder nicht-kovalent gebunden sind oder werden, verbunden sind, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, bereits verwendet werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymer, Schaumverbände, Kalziumalginate, Aktivkohle, Schaumstoff, Folien, Silikonschaum, Fleecestoffe, Kunstseide, Baumwollgase, Kautschuk, Paraffin und Paraffingase. Geeignete Kunststoffe sind dabei Polyethylene, Polyvinylene, Polyamide und Polyurethane. Die erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuren und HMG-Proteine sind bevorzugterweise an dem Trägermaterial in nicht-kovalenter Art und Weise absorbiert. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese kovalent gebunden sind und/oder unter den jeweiligen Anwendungsbedingungen eine Freisetzung derselben von dem eigentlichen Trägermaterial erfolgt. Geeignete Anwendungsmöglichkeiten sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt. Eine besondere Form des Trägermaterials ist das Wundabdeckmaterial, welches aus einem Basisdeckmaterial und einer oder mehreren Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en) besteht, wobei diese wie hierin beschrieben ausgestaltet sind. In diesem Falle kann das Basisdeckmaterial ein Trägermaterial im hierin beschriebenen Sinne darstellen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung, wobei die Verbindung der Förderung und/oder der Inhibierung eines Prozesses dient. Der Prozess kann dabei ein jeder der Prozesse, einzeln oder in beliebigen Kombina-

tionen, sein, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere kann der Prozess ausgewählt sein aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst.

Im einfachsten Falle sieht das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen einer Verbindung vor, dass die folgenden Schritte realisiert werden:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem System verursachten Reaktion.

Bei einem Testsystem handelt es sich bevorzugterweise um ein solches, welches erlaubt, den jeweiligen Prozess darzustellen, insbesondere darzustellen unter dem Einfluss einer Verbindung, von der vermutet wird, dass sie den Prozess entweder fördert oder inhibiert, einer sogenannten Kandidaten-Verbindung, und/oder unter dem Einfluss einer Referenz-Verbindung. Derartige Systeme sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Bevorzugterweise umfasst ein derartiges Testsystem eine oder mehrere Zellen, gegebenenfalls ein Gewebe oder Gewebe, die die besagte(n) Zelle(n) enthalten, wobei das Verhalten der Zellen bzw. des Gewebes untersucht wird. Das Verhalten ist dabei insbesondere Wanderung von Zellen, Ausschüttung von Signalmolekülen, Angiogenese oder Neovaskularisierung von Geweben. Neben dem direkten Wachstum können dabei auch andere Phänomene oder Parameter verwendet werden, um eine Reaktion des Testsystems zu beschreiben. Derartige Parameter können beispielsweise biochemische, genetische, molekulargenetische, molekularbiologische, histologische, zytologische, physiologische und phänotypische Parameter sein. Biochemische Parameter können beispielsweise Stoffwechselwege, typische Edukte ebenso wie Produkte davon sein, die mit den besagten Prozessen direkt oder indirekt verbunden sind. Genetische und molekulargenetische Parameter sind dabei solche, die auf der Ebene der Nukleinsäure, sowohl genomische Nukleinsäure als auch hnRNA, mRNA und dergleichen, mit den besagten Prozessen verbunden sind. Dabei kann es im Rahmen der vorliegenden Erfindung sein, dass als genetischer

Parameter das Auftreten einer entsprechenden Nukleinsäure gemessen wird, das Verschwinden einer entsprechenden Nukleinsäure, oder deren quantitative Veränderung bei der Förderung bzw. Inhibierung der besagten Prozesse. Mit molekularbiologischen Parametern können u.a. Proteine über deren Auftreten und Verschwinden mit den besagten Prozessen verbunden sein. Physiologische Parameter können dabei das Verhalten, insbesondere das Ansprechverhalten, der Zellen bzw. des Gewebes sein auf Reize, wie beispielsweise biologische, chemische oder physikalische Reize, die von dem jeweiligen Testsystem, d. h. den Zellen bzw. dem Gewebe in Abhängigkeit von dem Prozess bzw. dessen Förderung oder Inhibierung unterschiedlich beantwortet werden.

In einer Ausführungsform ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung derartiger Prozesse vorgesehen, dass neben einem entsprechenden Testsystem für den Prozess eine Referenz-Verbindung bereitgestellt wird und die Referenz-Verbindung mit dem Testsystem in Kontakt gebracht wird, d. h. die Referenz-Verbindung im Testsystem getestet wird. Dieses Kontaktieren erfolgt bevorzugterweise dadurch, dass die Referenz-Verbindung, bevorzugterweise in Form einer Lösung, bevorzugterweise in Lösung in einem Puffer vorliegend, mit dem Testsystem in Verbindung gebracht wird, bevorzugterweise dem Kulturmedium hinzugesetzt wird. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Inkontaktbringen der Referenz-Verbindung mit dem Testsystem ortsspezifisch erfolgt, beispielsweise die Referenz-Verbindung in bestimmte Zellen des Gewebes oder aber auch in bestimmte Kompartimente der Zelle(n) eingebracht wird. Die Zell-spezifische ebenso wie die Kompartiment-spezifische Verabreichung derartiger Referenz-Verbindungen sind den Fachleuten auf dem Gebiet grundsätzlich bekannt. Es können z.B. Referenz-Verbindungen über Mikroinjektion, in definierte Bereiche bzw. Kompartimente der Zelle injiziert werden wie beispielsweise beschrieben in Wang B et al (2001) Expression of a reporter gene after microinjection of mammalian artificial chromosomes into pronuclei of bovine zygotes. Mol Reprod Dev 60:433-8. Zudem stehen Verfahren zur Verfügung, Referenz-Verbindungen z.B. über Aminosäuretransporter zu behandeln oder zu modifizieren, so dass die Referenz-Verbindungen spezifische Zellen, wie z.B. Fibroblasten, wie beispielsweise beschrieben in Palacin M et al. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. Physiol Rev 78:969-1054, oder spezifische Zellkompartimente, wie z.B. den Nukleus, wie beispielsweise beschrieben in Chaloin L et al. (1998) Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and

nuclear localization properties. Biochem Biophys Res Commun 243:601-608, oder die Mitochondrien, wie beispielsweise beschrieben in Pain D et al. (1991) Machinery for protein import into chloroplasts and mitochondria. Genet Eng (N Y) 13:153-166., erreichen. Die Zellspezifische oder die Kompartiment-spezifische Verabreichung kann auch für die Kandidaten-Verbindung, wie hierin beschrieben, erfolgen.

In einem nächsten Schritt erfolgt eine Bestimmung der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion. Dabei können wiederum bevorzugterweise die vorstehend genannten Parameter verwendet werden, um den Einfluss der Referenz-Verbindung im Testsystem zu bestimmen. In einem weiteren Schritt dieser Ausführungsform des erfindungsge-mäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird sodann die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und diese, ähnlich wie die Referenz-Verbindung, in dem Testsystem getestet. Anschließend erfolgt die Bestimmung der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion, wobei grundsätzlich die im Zusammenhang mit der Referenz-Verbindung besprochenen Parameter herangezogen werden können. Schließlich wird die Reaktion des Testsystems, ausgedrückt durch die vorstehend genannten Parameter, unter dem Einfluss der Referenz-Verbindung mit dem Verhalten des Testsystems unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verglichen. Dabei wird eine Kandidaten-Verbindung als eine Verbindung zur Förderung eines oder mehrerer der besagten Prozesse bezeichnet, wenn der jeweilige Prozess unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung die gleiche Reaktion oder eine stärkere Reaktion in dem Testsystem hervorruft als die Referenz-Verbindung. Umgekehrt ist eine Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Inhibierung eines oder mehrerer der besagten Prozesse, wenn die Kandidaten-Verbindung im Testsystem eine Reaktion hervorruft, die geringer ist als die entsprechende Reaktion der Referenz-Verbindung. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass ein und dieselbe Kandidaten-Verbindung durchaus unterschiedliche Wirkungen im Sinne von Inhibierung bzw. Förderung für einen Prozess gegenüber einem anderen der vorstehend genannten Prozesse zeigt. Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die zeitliche Abfolge des Testens der Referenz-Verbindung und der Kandidaten-Verbindung auch umgekehrt werden kann.

In einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird wiederum ein Testsystem für den Prozess bereitgestellt und anschließend eine Referenz-Verbindung. In dieser Ausführungsform ist die Referenz-Verbindung sodann mit einer Markierung versehen. Grundsätzlich sind jegliche Markierungen geeignet, insbesondere solche, welche eine radioaktive, fluoreszierende, immunologische, Enzym- oder Affinitäts-Markierung umfasst bzw. eine solche erlaubt. Radioaktive Markierungen sind dabei insbesondere ^1H , ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^{51}Cr , ^{13}C und ^{14}C , Fluoreszenzmarkierungen umfassen dabei Markierungen mit Fluorescein, Fluorescamin, Isocyanat, Luciferase, Rhodamin, Texas Red, Cy3 und Cy5. Zu den immunologischen Markierungen gehören neben diversen Immunogenen u.a. die Immunglobuline IgM, IgA, IgD, IgE und IgG, inklusive, aber nicht darauf beschränkt, IgG1, IgG2a und IgG2b. Enzym-Markierungen umfassen insbesondere die alkalische Phosphatase und die Peroxidase. Zu den Affinitätsmarkierungen gehören GST- und His-Tag-Markierungen sowie Markierungen über Biotin und Digoxigenin. Bevorzugterweise wird die Markierung eine solche sein, welche die Reaktion, die die Referenz-Verbindung im Testsystem verursacht, nicht nachteilig beeinflusst. Eine solchermaßen markierte Referenz-Verbindung wird sodann, wie vorstehend beschrieben, im Testsystem getestet und die von ihr verursachte Reaktion im Testsystem bestimmt. In einem weiteren Schritt wird sodann eine Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und auch diese im Testsystem wie vorstehend geschildert getestet, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung während des Testens der durch die Kandidaten-Verbindung verursachten Reaktion enthält. Dabei ist bevorzugt, dass das Testen unter Bedingungen erfolgt, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung nach wie vor biologisch aktiv ist, d. h. die fördernde bzw. inhibierende Wirkung zeigt. Nach Zugabe der Kandidaten-Verbindung wird die Reaktion des Testsystems wiederum bestimmt, wobei es grundsätzlich möglich ist, dass die vorstehend beschriebenen biochemischen Parameter herangezogen werden. Bevorzugterweise wird in Ergänzung dazu oder alternativ dazu die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung mittels der entsprechenden Markierung oder aber die freigesetzte Markierung als solches bestimmt.

In einem noch weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist vorgesehen, dass eine Markierung der Kandidaten-Verbindung erfolgt. In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt wird und anschließend das Testsys-

tem getestet wird und die von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion bestimmt wird mit anschließender Bereitstellung einer Referenz-Verbindung, gefolgt vom Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, insbesondere unter Bedingungen, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung physiologisch aktiv ist, und die Reaktion des Testsystems bestimmt, wobei insbesondere die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird. Alternativ, aber auch in Ergänzung dazu, können die besagten Parameter bestimmt werden, wie vorstehend beschrieben, um die Reaktion sowohl der Referenz-Verbindung als auch der Kandidaten-Verbindung auf den jeweiligen Prozess zu charakterisieren. Es ist dabei auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn die Reihenfolge der Zugabe von Kandidaten-Verbindung und Referenz-Verbindung, unabhängig davon, welche der Verbindungen mit einer Markierung versehen ist, umgekehrt wird. Im ersten der beiden vorstehend beschriebenen Verfahrensweisen verdrängt die Referenz-Verbindung die Kandidaten-Verbindung, im zweiten Falle verdrängt die Kandidaten-Verbindung die Referenz-Verbindung. Schließlich ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bei den verschiedenen Aspekten der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren, bei denen eine Markierung entweder der Kandidaten-Verbindung oder der Referenz-Verbindung vorliegt, hierin auch als erste Markierung bezeichnet, auch die jeweils andere Verbindung eine Markierung trägt, im folgenden auch als zweite Markierung bezeichnet, wobei die erste und die zweite Markierung bevorzugterweise voneinander verschieden sind.

Im Rahmen einer jeglichen der erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist dabei vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, oder deren Transkriptionsprodukt oder deren Translationsprodukt, gegebenenfalls eine Kombination derselben, ist, wobei die Nukleinsäure eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Gene für HMG-Proteine umfasst. Besonders bevorzugte HMG-Proteine sind dabei jene, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere jene gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 bzw. die für Proteine codierenden Nukleinsäuren gemäß SEQ ID No. 31 bis 64 und jene, wie sie in den Tabellen 1 bzw. 2 dargestellt sind.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass im Rahmen der verschiedenen Anwendungen bzw. Verwendungen ein einzelnes der hierin beschriebenen HMG-Proteine und/oder eine einzelne dafür oder für eines der hierin beschriebenen HMG-Proteine codierende Nukleinsäure verwendet wird. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine Mischung aus zwei oder mehreren der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Es ist weiterhin im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Begriffe Protein und Peptid bzw. Polypeptid hierin synonym verwendet werden.

Ein weitere Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von HMG-Proteinen bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren und bevorzugterweise der mit ihnen in Wechselwirkung tretenden Moleküle, die bevorzugterweise diese antagonisieren, um bestimmte biologische Prozesse zu inhibieren. Aufgrund dieser Inhibierung ist die Prävention oder Behandlung von Krankheiten möglich, die mit diesen Prozessen kausal oder symptomatisch in Beziehung stehen. Derartige Krankheiten umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis, die hierin auch als „vorstehend genannte Erkrankungen“ bezeichnet werden. Bei den vorstehend genannten Erkrankungen kann es sich dabei sowohl um entsprechende Erkrankungen des Menschen als auch um entsprechende Erkrankungen von Tieren handeln, insbesondere von Haustieren, Zootieren, Nutztieren und dergleichen handeln. HMG-Proteine, wie mit diesem und anderen Aspekten diskutiert, umfassen alle HMG-Proteine, insbesondere die hierin beschriebenen HMG-Proteine, HMG-Peptide und Fragmente davon sowie die jeweils dafür codierende Nukleinsäure.

Infolge dieser kausalen Zusammenhänge betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung Mittel zur Prävention und/oder Behandlung der vorstehenden Erkrankungen. Derartige Mittel sind bevorzugterweise solche, die die Wirkung der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren inhibieren bzw. antagonisieren. Entsprechende Mittel sind Polypeptide, die an HMG-Proteine oder dafür codierende Nukleinsäuren binden, ebenso wie Antikörper, die an HMG-Proteine oder dafür codierende Nukleinsäuren binden. Weitere Mittel, die zur Prävention oder Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzt werden können, sind siRNA oder RNAi, Aptamere, Spiegelmer, Antisense-Moleküle und Ribozyme. Insoweit betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung derartiger Mittel zur Herstellung von Medika-

menten, insbesondere Medikamenten zur Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen.

Die vorstehend genannten Mittel können von den Fachleuten auf dem Gebiet im Rahmen ihrer Kenntnisse hergestellt werden. Als Zielmolekül bzw. Grundlage für die Herstellung dient dabei ein jegliches hierin offenbartes HMG-Protein, Fragment davon oder eine für das Protein oder Fragment davon codierende Nukleinsäure, wie insbesondere hierin auch offenbart. Dabei ist besonders bevorzugt, dass es sich bei dem Protein um HMGB1 handelt sowie Teile davon, insbesondere die A-Domäne von HMGB1. Bei den erfindungsgemäßen Mitteln, die erfindungsgemäß zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und/oder Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen verwendet werden können, handelt es sich somit um einen Antikörper gegen HMG-Proteine oder Fragmente davon, Peptide, die an HMG-Proteine oder Fragmente davon binden, siRNA, die gegen mRNA von HMG-Proteinen oder Fragmenten davon gerichtet ist, Antisense-Moleküle, die gegen die für HMG-Proteine oder Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind, Antisense-Moleküle, die gegen für HMG-Proteine oder Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind, Ribozyme, die gegen HMG-Proteine oder Fragmente davon codierenden Nukleinsäuren, insbesondere mRNA oder hnRNA, gerichtet sind. Weiterhin sind die Mittel Aptamere und Spiegelmere, die gegen ein HMG-Protein oder ein Fragment davon oder gegen eine dafür codierende Nukleinsäure gerichtet sind.

Antikörper, wie hierin verwendet, sind bevorzugterweise monoklonale Antikörper, die gemäß dem Protokoll von Cäsar und Milstein und Weiterentwicklungen davon hergestellt werden können. Antikörper sind dabei auch Antikörperfragmente oder -derivate, wie bspw. Fab-Fragmente, Fc-Fragmente aber auch einzelsträngige Antikörper, solange diese generell in der Lage sind, HMGB spezifisch zu binden. Neben monoklonalen Antikörpern können auch polyklonale Antikörper verwendet werden. Ein polyklonaler Antikörper für die Grundlagenforschung, der grundsätzlich auch als Medikament verwendet werden könnte, ist bspw. der gegen HMGB1 gerichtete Antikörper sc-12523 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Bevorzugterweise sind die verwendeten Antikörper humane oder humanisierte Antikörper.

Peptide oder Polypeptide, die mit HMG-Protein oder einer dafür codierenden Nukleinsäure in Wechselwirkung treten, können mit im Stand der Technik bekannten Verfahren wie beispielsweise Phage-Display gescreeent werden. Diese Techniken sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Dabei wird bei der Erzeugung derartiger Peptide typischerweise so vorgegangen, dass eine Peptid-Bibliothek angelegt wird, bspw. in Form von Phagen, und diese Bibliothek in Kontakt gebracht wird mit einem Zielmolekül, d. h. einem HMG-Protein, bevorzugterweise mit HMGB1. Die bindenden Peptide werden sodann typischerweise als Komplex zusammen mit dem Zielmolekül von den nicht bindenden Mitgliedern der Bibliothek entfernt. Es ist dabei im Rahmen der Kenntnisse der Fachleute auf diesem Gebiet, dass die Bindungseigenschaften zumindest bis zu einem bestimmten Umfang von den jeweils konkret vorliegenden Versuchsbedingungen, wie bspw. Salzgehalt und dergleichen, abhängen. Nach Abtrennen der mit einer höheren oder stärkeren Affinität oder Kraft an das Zielmolekül bindenden Peptide von den nicht-bindenden Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Zielmolekül können diese sodann charakterisiert werden. Gegebenenfalls ist vor der Charakterisierung ein Amplifikationsschritt, bspw. durch Vermehrung der entsprechenden, das Peptid bzw. die Peptide codierende Phagen erforderlich. Die Charakterisierung umfasst bevorzugter Weise die Sequenzierung der an das jeweilige HMG bindenden Peptide. Die Peptide sind dabei hinsichtlich Ihrer Länge grundsätzlich nicht beschränkt. Typischerweise werden in derartigen Verfahren jedoch Peptide mit einer Länge von 8 bis 20 Aminosäuren erhalten bzw. verwendet. Die Größe der Bibliotheken beträgt 10^2 bis 10^{18} , bevorzugter Weise 10^8 bis 10^{15} verschiedene Peptide.

Eine spezielle Form von an Zielmolekülen bindenden Polypeptiden stellen die Anticaline dar, wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung DE 197 42 706 beschrieben sind.

Weiterhin können auch kleine Moleküle verwendet werden, die die Wirkung der HMG-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäure antagonisieren. Derartige kleine Moleküle können beispielsweise durch ein Screeningverfahren, insbesondere ein Screening von Bibliotheken kleiner Moleküle identifiziert werden. Dabei wird das Zielmolekül mit einer Bibliothek in Kontakt gebracht und jene Mitglieder der Bibliothek, die daran binden, ermittelt, gegebenenfalls von den anderen Mitgliedern der Bibliothek bzw. vom Target abgetrennt und optional weiter charakterisiert. Auch hier wird die Charakterisierung des kleinen Moleküls nach den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannten Verfahrensweisen erfolgen, so z.B. die

Verbindung identifiziert und die Molekularstruktur bestimmt werden. Diese Bibliotheken umfassen dabei so wenig wie zwei und soviel wie bis zu mehrere 100 000 Mitglieder. Aptamere, wie hierin verwendet, sind D-Nukleinsäuren, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig, die spezifisch an ein Zielmolekül binden. Die Herstellung von Aptameren ist bspw. beschrieben im Europäischen Patent EP 0 533 838. Dabei wird wie folgt vorgegangen:

Bei dem Verfahren zur Erzeugung der Aptameren wird eine Mischung aus Nukleinsäuren, d. h. potentiellen Aptameren bereitgestellt, wobei eine jede Nukleinsäure aus einem Segment aus wenigstens acht aufeinanderfolgenden, randomisierten Nukleotiden besteht und diese Mischung mit dem Target, im vorliegenden Falle somit mit HMG-Proteinen, für sie codierenden Nukleinsäuren, HMG-Wechselwirkungspartnern, insbesondere den natürlichen Wechselwirkungspartnern und/oder für sie codierenden Nukleinsäuren in Kontakt gebracht wird, wobei Nukleinsäuren, die an das Target binden, ggf. auf der Grundlage einer erhöhten Affinität, verglichen mit der Kandidatenmischung, vom Rest der Kandidatenmischung abgetrennt werden und die solchermaßen erhaltenen an das Target, ggf. mit einer höheren Affinität oder Kraft, bindenden Nukleinsäuren amplifiziert werden. Diese Schritte werden mehrfach wiederholt, so dass am Ende des Verfahrens spezifisch an das jeweilige Target oder Zielmolekül bindende Nukleinsäuren, sogenannte Aptamere, erhalten werden. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Aptamere stabilisiert werden können, bspw. durch Einführung bestimmter chemischer Gruppen, wie den Fachleuten auf dem Gebiet der Aptamer-Entwicklung bekannt. Aptamere werden derzeit bereits therapeutisch eingesetzt. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die solchermaßen hergestellten Aptamere für die Targetvalidierung und als Leitsubstanzen für die Entwicklung von Medikamenten, insbesondere von kleinen Molekülen, verwendet werden.

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Prinzip beruht die Herstellung oder Erzeugung von Spiegelmeren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung auf der Grundlage der HMG-Proteine, der für sie codierenden Nukleinsäuren, der HMG-Wechselwirkungspartner, insbesondere der natürlichen Wechselwirkungspartner, und/oder der für sie codierenden Nukleinsäuren als Zielmolekül entwickelt werden können. Die Herstellung von Spiegelmeren ist bspw. beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO 98/08856. Spiegelmere sind L-Nukleinsäure, d.h. bestehen aus L-Nukleotiden, und zeichnen sich im wesentlichen dadurch aus, dass sie in biologischen Systemen eine sehr hohe Stabilität aufweisen und gleichzeitig,

vergleichbar den Aptameren, mit einem Zielmolekül spezifisch wechselwirken bzw. an dieses binden können. Dabei wird genauer so vorgegangen, dass eine heterogene Population aus D-Nukleinsäuren erzeugt wird, die Population mit dem optischen Antipoden des Zielmoleküls in Kontakt wird, im vorliegenden Falle somit mit dem D-Enantiomer des natürlicher Weise auftretenden L-Enantiomers, sodann jene D-Nukleinsäuren abgetrennt werden, die nicht mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, die D-Nukleinsäuren, die mit der optischen Antipode des Zielmoleküls in Wechselwirkung getreten sind, bestimmt, ggf. abgetrennt und sequenziert werden und anschließend L-Nukleinsäuren synthetisiert werden, die in ihrer Sequenz mit derjenigen zuvor für die D-Nukleinsäuren ermittelten Sequenzen identisch sind. Ähnlich dem Verfahren zur Herstellung von Aptameren ist es auch hier möglich, durch mehrfaches Wiederholen der Schritte geeignete Nukleinsäuren, d.h. Spiegelmere anzureichern bzw. zu erzeugen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, die unter Verwendung der HMG-Proteine und der dafür codierenden Nukleinsäuren hergestellt bzw. entwickelt werden können, sind Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide und RNAi.

All diesen Klassen ist dabei gemein, dass sie nicht auf der Ebene des Translationsproduktes, d.h. auf der Ebene der HMG-Proteine und Wechselwirkungspartner davon, insbesondere HMGB1, ihre Wirkung entfalten, sondern auf der Ebene der für das jeweilige Protein codierenden Nukleinsäure, insbesondere der für HMGB1 codierenden mRNA.

Bei Ribozymen handelt es sich um katalytisch aktive Nukleinsäuren, die bevorzugter Weise aus RNA aufgebaut sind und aus zwei Teilbereichen bestehen. Der erste Teilbereich ist für eine katalytische Aktivität verantwortlich, wohingegen der zweite Teil für eine spezifische Wechselwirkung mit einer Ziel-Nukleinsäure verantwortlich ist. Kommt es zur Ausbildung einer Wechselwirkung zwischen der Ziel-Nukleinsäure und dem zweiten Teil des Ribozyms, typischer Weise durch Hybridisierung von zueinander im wesentlichen komplementären Basenbereichen, kann der katalytische Teil des Ribozyms entweder intramolekular oder intermolekular, wobei letzteres bevorzugt ist, die Ziel-Nukleinsäure hydrolysieren für den Fall, dass die katalytische Wirkung des Ribozyms eine Phosphodiesterase-Aktivität ist. In der Folge kommt es zu einem – ggf. weiteren – Abbau der codierenden Nukleinsäure, wobei der Titer des Zielmoleküls sowohl auf der Nukleinsäure- als auch der Proteinebene sowohl intrazellulär

als auch extrazellulär verringert wird und somit eine therapeutischer Ansatz bei Erkrankungen des Endometriums bereitgestellt wird. Ribozyme, deren Verwendung sowie Konstruktionsprinzipien sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und bspw. beschrieben in Doherty und Doudna (Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001;30:457-75) und Lewin und Hauswirth (Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* 2001, 7:221-8).

Auf einem grundsätzlich ähnlichen Wirkmechanismus beruht die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden zur Herstellung eines Medikamentes bzw. diagnostischen Mittels. Antisense-Oligonukleotide hybridisieren infolge Basenkomplementarität typischerweise mit einer Ziel-RNA, normaler Weise mit mRNA und aktivieren dadurch RNAaseH. RNAaseH wird sowohl durch Phosphodiester als auch Phosphorothioat-gekoppelte DNA aktiviert. Phosphodiester-gekoppelte DNA wird jedoch schnell durch zelluläre Nukleasen mit Ausnahme von Phosphorothioat-gekoppelter DNA abgebaut. Diese resistenten, nicht-natürlicher Weise auftretende DNA-Derivate inhibieren RNAaseH nicht, wenn sie mit RNA hybridisiert sind. Mit anderen Worten, Antisense-Polynukleotide sind nur als DNA-RNA-Hybridkomplex wirksam. Beispiele für derartige Antisense-Oligonukleotide finden sich, u.a. in US-Patent US 5,849,902 oder US 5,989,912. Prinzipiell besteht das wesentliche Konzept der Antisense-Oligonukleotide darin, gegen bestimmte RNA eine komplementäre Nukleinsäure bereitzustellen. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der Nukleinsäuresequenz der HMG-Proteine und ihrer Wechselwirkungspartner, insbesondere der jeweiligen mRNA, können durch Basenkomplementarität geeignete Antisense-Oligonukleotide hergestellt werden, die zu einem Abbau der codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA, führen.

Eine weitere Klasse von Verbindungen, die als Medikament bzw. diagnostisches Mittel grundsätzlich geeignet wären, ist die sogenannte RNAi. RNAi ist eine doppelsträngige RNA, die RNA-Interferenz vermittelt und typischerweise eine Länge von etwa 21 bis 23 Nukleotiden aufweist. Dabei entspricht einer der beiden Stränge der RNA einer Sequenz eines abzubauenen Genes. Mit anderen Worten, ausgehend von der Kenntnis der für die HMG und/oder deren Wechselwirkungspartner codierenden Nukleinsäure, insbesondere der mRNA, kann eine doppelsträngige RNA hergestellt werden, wobei einer der beiden RNA-Stränge komplementär zu der besagten, für die HMG und/oder deren Wechselwirkungspartner codierenden Nukleinsäure ist, bevorzugter Weise zur mRNA, und diese dann zum Abbau der ent-

sprechenden codierenden Nukleinsäure führt und damit einhergehend zu einer Verringerung des Titors der jeweiligen Proteine. Die Erzeugung und Verwendung von RNAi als Medikament bzw. diagnostisches Mittel ist bspw. beschrieben in den Internationalen Patentanmeldungen WO 00/44895 und WO 01/75164.

Mit Blick auf die Wirkmechanismen der vorstehend beschriebenen Klassen, Ribozymen, Antisense-Oligonukleotiden sowie RNAi, ist es somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, neben den HMG-Proteinen, insbesondere HMGB1, und deren insbesondere natürlichen Wechselwirkungspartnern auch die dafür codierenden Nukleinsäuren, insbesondere die mRNA, zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention der vorstehend genannten Erkrankungen, nämlich Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis, bzw. für die Herstellung eines diagnostischen Mittels für die Diagnose der vorstehend genannten Erkrankungen und dem Überwachen des Verlaufes der Erkrankung bzw. der angesetzten Therapie, entweder direkt oder als Zielmolekül, zu verwenden.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die vorstehend genannten Klassen von Verbindungen, d. h. Antikörper, Peptide, Antikaline, kleine Moleküle, Aptamere, Spiegelmerre, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide sowie RNAi, die gegen die HMG-Proteine, Fragmenten davon oder dafür codierenden Nukleinsäuren gerichtet sind und bevorzugterweise die Wirkung dieser HMG-Proteine bzw. der dafür codierenden Nukleinsäuren antagonisieren, für die Herstellung von Medikamenten zur Behandlung und/oder Prävention insbesondere von Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis verwendet werden. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese Medikamente bzw. Mittel nicht nur für die Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen, sondern auch für diagnostische Zwecke verwendet werden können, mithin die vorstehend genannte Mittel auch als Diagnostika oder diagnostische Mittel verwendet werden können, bevorzugterweise für Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis.

Die diese Mittel enthaltenden pharmazeutischen oder diagnostischen Zusammensetzungen umfassen in einer Ausführungsform neben einer oder mehreren der vorstehend genannten bzw., wie hierin offenbart, erzeugten Verbindungen noch andere pharmazeutisch oder dia-

gnostisch wirksame Verbindungen oder Mittel, sowie bevorzugterweise zumindest einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. Derartige Träger können bspw. flüssig oder fest sein, bspw. eine Lösung, ein Puffer, eine alkoholische Lösung und dergleichen. Als geeignete feste Träger kommen bspw. Stärke und dergleichen in Betracht. Es ist den Fachleuten auf dem Gebiet der pharmazeutischen Darreichungsformen bekannt, wie die entsprechenden Verbindungen der verschiedenen Klassen formuliert werden müssen, um auf dem jeweils angestrebten Darreichungsweg, bspw. oral, parenteral, subcutan, intravenös und dergleichen mehr, verabreicht werden zu können.

Neben den vorstehend beschriebenen Mitteln, die HMG-Proteine, Fragmente davon oder dafür codierende Nukleinsäuren antagonisieren, d. h. kleine Moleküle, Peptide, Anticaline, Antikörper, Aptamere, Spiegelmere, Ribozyme, Antisense-Oligonukleotide (hierin auch als Antisense-Moleküle bezeichnet) sowie RNAi, kann auch der Zelloberflächenrezeptor RAGE oder Fragmente davon zu diesen Zwecken verwendet werden, d. h. als Mittel für die Herstellung eines diagnostischen Mittels für Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis oder eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention von Tumoren, Tumorerkrankungen, Histiozytose, entzündliche Erkrankungen, Entzündungen und Arthritis verwendet werden. Der Rezeptor, bzw. die davon abgeleiteten Fragmente, können, ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, infolge bevorzugterweise kompetitiver Inhibierung die Wirkung der HMG-Proteine, insbesondere des HMGB1-Proteins antagonisieren. Daraus ergibt sich die erfindungsgemäße Verwendung des Zelloberflächenrezeptors RAGE bzw. seiner Fragmente bzw. der für ihn codierenden Nukleinsäuren zur Herstellung eines Medikamentes oder Diagnostikums für die Behandlung der vorstehend genannten Erkrankungen.

Dieser Wirkmechanismus beruht darauf, dass HMG-Proteine, insbesondere HMGB1, extrazellulär ein Ligand des Zelloberflächenrezeptors RAGE ist (receptor for advanced glycation end products), der beispielsweise bei Taguchi et al. beschrieben ist (Taguchi, A., Blood, D.C., del Toro, G., Canet, A., Lee, D.C., Qu, W., Tanji, N., Lu, Y., Lalla, E., Fu, C., Hofmann, M.A., Kislinger, T., Ingram, M., Lu, A., Tanaka, H., Hori, O., Ogawa, S. Stern, D.M., Schmidt, A.M. (2000). Nature 405: 354-360).

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren, Beispiele sowie des Sequenzprotokolls erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausgestaltungsformen und Vorteile ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 ein Diagramm mit Sprossenlängen aus Sphäroiden nach Behandlung mit VEGF oder HMGB1-Protein;

Fig. 2 ein Diagramm mit Sprossenlängen aus Sphäroiden nach Behandlung mit VEGF oder HMGA1-Protein.

Beispiel 1: Kultivierung von Endothelzellen

Methode:

Für die Kultivierung von humanen Endothelzellen wurden Arterienpräparate der Arteria carotis verwendet. Nach der Entnahme wurden die Gewebstücke bis zur Präparation in Hanks-Lösung gelagert. Die Präparation erfolgte in Hanks-Lösung, indem die Intima vorsichtig von der Media getrennt wurde. Anschließend wurden die ca. 1 mm großen Gewebstückchen auf Deckgläschen gelegt und umgekehrt in der Zellkulturflasche kultiviert. Die Vorkultivierung erfolgt in 1 ml endothelialem Wachstumsmedium mit den dazugehörigen Wachstumsfaktoren bei 37°C und 5 % CO₂. Nach dem Erreichen einer konfluenten Zelldichte wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert und 1:3 geteilt.

Ergebnisse:

Nach ca. 2 Wochen konnten erste ausgewanderte Zellen beobachtet werden. Zur Verifizierung der Zellen wurde eine Immunhistochemie mit dem anti human CD 31 endothelial cell Antikörper durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um humane Endothelzellen handelt.

Beispiel 2: Proliferationstest endothelialer Zellen durch die Applikation von HMGB1**Optimierung der Zellzahl****Methode:**

Der Proliferationstest wurde mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit der Firma Roche durchgeführt.

Zur Ermittlung der optimalen Zellzahl wurden verschiedene Verdünnungen der Endothelzellen ($10^5 - 10^2$ Zellen/100 μ l) in 96 well Platten für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in dem entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert. Als Kontrolle diente das entsprechende Wachstumsmedium. Anschließend wurde pro Napf 10 μ l BrdU (Konzentration: 10 μ M) zugegeben und der Ansatz für 2h 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, erfolgte die Fixierung der Zellen mit 200 μ l/Napf Fixierungslösung durch eine Inkubation von 30 min bei RT. Danach wurden 100 μ l/Napf anti-BrdU-Antikörper zugegeben und 90 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers wurde der Ansatz dreimal mit 200 μ l Waschlösung gewaschen. Um die Proliferation mittels kolorimetrischer Bestimmung zu messen, wurde zu dem Ansatz 100 μ l/Napf Substrat gegeben, nach ca. 5 min mit 25 μ l/Napf 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption von 450 nm zu 750 nm mittels Anthos readers 2001 gemessen. Es wurden pro Verdünnung drei Ansätze durchgeführt.

Ergebnisse:

Nach Berechnung des Mittelwertes der Parallelansätze wurden die verschiedenen Verdünnungen der Endothelzellen mittels Microsoft Excel graphisch dargestellt und ausgewertet. Dabei ergab sich eine optimale Zellzahl von 5.000-7.500 Zellen/100 μ l.

Applikation von HMGB1 zu Endothelzellen**Methode:**

Die Kultivierung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Nach Verteilung der optimalen Zellzahl der Endothelzellen in die entsprechenden Näpfe einer 96 Napf-Platte wurde der Ansatz für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Zugabe von verschiedenen HMGB1-Konzentrationen (1 µg, 0,1 µg und 10 ng). Es wurden pro HMGB1-Konzentration 3 Parallelansätze durchgeführt. Nach einer Kultivierung von weiteren 24 h erfolgte die Zugabe von BrdU. Die weiteren Schritte wurden wie in Beispiel 2 unter „Optimierung der Zellzahl“ beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

Es konnte bei den Endothelzellen, denen HMGB1 appliziert wurde, eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der applizierten HMGB1-Konzentration gezeigt werden. Allgemein konnte bei den Zellen, denen HMGB1 appliziert wurde, eine erhöhte Mitoserate makroskopisch festgestellt werden.

Beispiel 3: Untersuchungen zur proangiogenen Wirkung von HMGB1 im Sphäroidmodell**Methode:**

Vorbereitend wurden humane Endothelzellen mit dem entsprechenden endothelialen Wachstumsmedium bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die für die Versuche verwendeten Endothelzellen stammten aus der 2. bzw. 3. Passage. Nach der Kultivierung wurden die Zellen trypsinisiert und in dem entsprechenden Wachstumsmedium mit einem 20%igen Anteil Methocel resuspendiert. Nach einer Inkubation von ca. 4 h bildeten die Zellen spontane dreidimensionale Zellkugeln (Sphäroide), die dann in ein Kollagengel eingebettet wurden. Für den entsprechenden Wachstumstest wurden diesem Gel folgende HMGB1-Konzentrationen zugegeben: 2 µg/ml; 0,4 µg/ml und 0,08 µg/ml. Als Referenz diente der endotheliale Wachstumsfaktor

VEGF in einer Konzentration von 25 ng/ml bzw. wurde als Negativkontrolle kein Wachstumsfaktor zu dem Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurden die Ansätze unter einem inversen Mikroskop mit einer Digitalkamera erfasst. Die Aufnahmen wurden direkt in die Bildanalyse-Software analySIS von Soft Imaging System eingelesen und ausgewertet.

Ergebnisse:

Mittels der Bildanalyse-Software konnte die additive Sprosslänge, d. h. die Gesamtlänge der von einem Sphäroid ausgehenden Sprossung ermittelt werden. Dabei konnte eine signifikante proangiogene Wirkung von HMGB1 bei einer Konzentration von 2 µg/ml ermittelt werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte hier ein deutliches Sprossen beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die Kombination VEGF/HMGB1 ein stärkeres Aussprossen als nur HMGB1. Das Ergebnis ist graphisch in Fig. 1 dargestellt.

Beispiel 4: Untersuchungen zur proangiogenen Wirkung von HMGA1 im Sphäroidmodell**Methode:**

Vorbereitend wurden humane Endothelzellen mit dem entsprechenden endothelialen Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die für die Versuche verwendeten Endothelzellen stammten aus der 2. bzw. 3. Passage. Nach der Kultivierung wurden die Zellen trypsiniert und in dem entsprechenden Wachstumsmedium mit einem 20%igen Anteil Methocel resuspendiert. Nach einer Inkubation von ca. 4 h bildeten die Zellen spontane dreidimensionale Zellkugeln (Sphäroide), die dann in ein Kollagengel eingebettet wurden. Für den entsprechenden Wachstumstest wurden diesem Gel eine HMGA1-Konzentration von 2 µg/ml zugegeben. Als Referenz diente der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF in einer Konzentration von 25 ng/ml bzw. wurde als Negativkontrolle kein Wachstumsfaktor zu dem Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen wurden die Ansätze unter einem inversen Mikroskop mit einer Digitalkamera erfasst. Die Aufnahmen wurden direkt in die Bildanalyse-Software analySIS von Soft Imaging System eingelesen und ausgewertet.

Ergebnisse:

Mittels der Bildanalyse-Software konnte die additive Sprossenlänge, d. h. die Gesamtlänge der von einem Sphäroid ausgehenden Sprossung ermittelt werden. Dabei konnte eine proangiogene Wirkung sowohl von HMGA1a als auch HMGA1b bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden. In der Kombination HMGA 1a konnte eine Steigerung des Aussprossens gezeigt werden im Vergleich zu VEGF ohne HMG-Protein. Die Ergebnisse sind graphisch in Fig. 2 dargestellt.

Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen, den Zeichnungen sowie dem Sequenzprotokoll, das Teil der Beschreibung sein soll, offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

BOHMANN & LOOSEN

Anwaltssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.^{*1}

Rechtsanwalt
Peter Loosen, LL.M.²

*Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

Zustelladresse:
Sonnenstr. 8
D-80331 München

Unser Zeichen
Our ref

A 10009

Ihr Zeichen
Your ref

Neuanmeldung
(Patent)

Datum
Date

München, 08. Oktober 2003

alcedo biotech GmbH, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen

Weitere Verwendung von HMG

Ansprüche

1. Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Reaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst.

2. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die mit mangelnder oder übermäßiger Angiogenese oder Neovaskularisierung oder mit

Wundheilung im Zusammenhang steht oder transmyokardiale Revaskularisierung erforderlich macht,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Psoriasis, Rosacea, Besenreisevarizen, eruptives Hämangiom, Tumorerkrankungen, kavernoöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Artherosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischen Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die die HMGA-Familie, die HMGB-Familie und die HMGN-Familie umfasst.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGB1, HMGB2 und HMGB3 umfasst.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein HMGB1 ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c und HMGA2 umfasst.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein HMGA1a ist.

12. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein High Mobility Group Protein aus der HMGA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

13. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich VEGF oder eine dafür codierende Nukleinsäure verwendet wird.

14. Verfahren zur Beeinflussung der Angiogenese oder Neovaskularisierung oder der Wundheilung von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,

b) Zugabe einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) und

c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en),

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, und optional

d) Erhalten oder Wiedergewinnen des Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewebe oder ein Teil davon mit VEGF und/oder einer dafür codierenden Nukleinsäure inkubiert wird.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass es ein *in vitro*-Verfahren ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewebe explantiertes Gewebe oder *in vitro* gezüchtetes Gewebe ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehrere der HMGB-Proteine oder der dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden, wobei bevorzugterweise ein High Mobility Group-Protein aus der HMGBA-Familie ausgewählt ist, und ein zweites High Mobility Group-Protein aus der HMGB-Familie ausgewählt ist, wobei das Protein aus der HMGBA-Familie bevorzugterweise HMGA1a und das Protein aus der HMGB-Familie bevorzugterweise HMGB1 ist.

20. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich zu der/den Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(en) und/oder deren Translationsprodukt(en), wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt oder Translationsprodukt verwendet wird, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für Vascular Endothelial Growth Factor umfasst

21. Pharmazeutische Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

22. Trägermaterial umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

23. Trägermaterial nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips, synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylene, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

24. Trägermaterial nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

25. Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

26. Wundabdeckungsmaterial nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, Hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, Absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

27. Formulierung umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e), wobei die Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) ein(e) solche(s) ist/sind, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase bevorzugterweise aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in

Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

28. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

29. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und

f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

30. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

31. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Vaskularisierung und Wundheilung umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;

c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;

d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und

e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenz-Verbindung eine oder mehrere Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) umfasst, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst, insbesondere wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 28 bis 34, wobei der Prozess die Inhibierung der Angiogenese ist.

37. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 28 bis 36 zum Screenen einer Verbindung zur Behandlung und/oder Prävention einer Erkrankung, wobei das bereitgestellte Testsystem ein Testsystem für die jeweilige Krankheit ist.

38. Verwendung nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die solche Krankheiten umfasst, die Förderung oder Inhibierung von Angiogenese oder Neovaskularisierung erforderlich machen oder transmyokardiale Revaskularisierung oder Wundheilung erforderlich machen.

39. Verwendung nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die diabetische Retinopathie, proliferative Retinopathia diabetica, diabetische Nephropathie, Makuladegeneration, Arthritis, Psoriasis, Rosacea, Besenreiservarizen, eruptives Hämangiom, kavernöses Hämangiom, Lippenangiom, Hämangiosarkom, Hämorrhoiden, Arteriosklerose, Angina pectoris, Ischämie, Infarkt, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom, Melanom, Kaposi-Sarkom, Tumore, Gestose, Unfruchtbarkeit, akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden, OP-Wunden und chronische Wunden umfasst.

40. Verwendung nach einem der Ansprüche 37 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankung eine Tumorerkrankung ist, wobei bevorzugterweise die Tumorerkrankung nekrotische Zellen, bevorzugterweise nekrotische Tumorzellen aufweist.

Weitere Verwendung von HMG

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung, insbesondere in vitro, einer oder mehrerer Nukleinsäure(n), deren Transkriptionsprodukt(e) und/oder deren Translationsprodukt(e) für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Angiogenese, Neovaskularisierung, transmyokardiale Revaskularisierung, Wundheilung, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Gene für High Mobility Group-Proteine umfasst.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> alcedo biotech GmbH

<120> Weitere Verwendung von HMG

<130> A 10009

<160> 64

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln
5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln
20 25 30

Pro Pro Val Ser Pro Gly Thr Ala Leu Val Gly Ser Gln Lys Glu Pro
35 40 45

Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser
50 55 60

Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr Thr Thr Pro Gly
65 70 75 80

Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu
85 90 95

Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
100 105

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln
1 5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln
20 25 30

Pro Pro Lys Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly

35

40

45

Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu
 65 70 75 80

Lys Glu Glu Glu Glu Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln
 85 90 95

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Glu Glu
 85 90 95

Thr Glu Glu Thr Ser Ser Gln Glu Ser Ala Glu Glu Asp
 100 105

<210> 4

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp

<210> 5
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Glu Glu Phe Tyr Ile Ala Ala
 85 90

<210> 6
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Thr Ile Ala Leu Cys Thr His Trp Ile Asn Ile Cys
85 90 95

<210> 7

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
50 55 60

As Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro
70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys
85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys
100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu
 210 215

<210> 8
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro
 85 90 95

Pro Pro Pro Arg Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Arg Leu Leu Ser Ser
 100 105 110

Trp Asp Tyr Arg His Pro Pro Pro His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe
 115 120 125

Ser Arg Asp Arg Val Ser Pro Cys Trp Pro Gly Trp Ser Arg Thr Pro
 130 135 140

Asp Leu Arg
 145

<210> 9
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Asp Asn Leu Leu Pro Arg Thr Ser Ser Lys Lys Lys Thr
 85 90 95

Ser Leu Gly Asn Ser Thr Lys Arg Ser His
 100 105

<210> 10
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Trp Leu Leu Met Lys Ser Pro Cys Trp
 85 90

<210> 11
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Tyr Ser
 85 90 95

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Val Asn

85

90

95

Val Ala Leu Pro Gly Lys Asp His Pro Gly Asn Leu Ile Tyr Leu Leu
 100 105 110

Phe Ser Lys Asn Ala Thr
 115

<210> 13
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Asp
 85 90 95

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
 1 5 10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
 1 5 10

<210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
 5 10

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
 1 5 10

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys
 1 5 10

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys
 1 5 10

<210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Arg Lys Trp Pro Gln Gln
1 5 10 15

Val Val Gln Lys Lys
20

<210> 23
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln
1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser
35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala
50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly
65 70 75

<210> 24
<211> 71
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg
1 5 10 15

Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu
20 25 30

Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu
35 40 45

Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu
 50 55 60

Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile
 65 70

<210> 25
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn
 20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser
 35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala
 50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr
 65 70

<210> 26
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser
 1 5 10 15

Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly
 20 25 30

Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp
 35 40 45

Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr
 50 55 60

Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
 65 70 75

<210> 27
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln
 35 40 45

Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp
 50 55 60

Ile Ala Ala Tyr Arg
 65

<210> 28
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln
 35 40 45

Pro

<210> 29
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu

20

25

30

Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu
 35 40 45

Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Lys Lys
 50 55 60

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Leu Ala Phe Phe Leu
 65 70 75 80

Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu
 85 90 95

Ser Ile Asp Asp Val Val Lys Lys Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr
 100 105 110

Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys
 115 120 125

Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro
 130 135 140

Asn Ser Ala Lys Lys Arg Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys
 145 150 155 160

Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Gln Glu Glu Glu Asn Glu
 165 170 175

Glu Asp Asp Asp Lys
 180

<210> 30
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala

50

55

60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Asn Thr Leu Glu Gln Cys Asn Val Cys Ser Lys Pro Ile
 85 90 95

Met Glu Arg Ile Leu Arg Ala Thr Gly Lys Ala Tyr His Pro His Cys
 100 105 110

Phe Thr Cys Val Met Cys His Arg Ser Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr
 115 120 125

Val Asp Ala Gly Gly Leu Ile His Cys Ile Glu Asp Phe His Lys Lys
 130 135 140

Phe Ala Pro Arg Cys Ser Val Cys Lys Glu Pro Ile Met Pro Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Glu Glu Thr Val Arg Ile Val Ala Leu Asp Arg Asp Phe His
 165 170 175

Val His Cys Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Gly Leu Leu Ser Glu Gly
 180 185 190

Asp Asn Gln Gly Cys Tyr Pro Leu Asp Gly His Ile Leu Cys Lys Thr
 195 200 205

Cys Asn Ser Ala Arg Ile Arg Val Leu Thr Ala Lys Ala Ser Thr Asp
 210 215 220

Leu
 225

<210> 31
 <211> 1873
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> NCIB Accession No. M23614

<400> 31
 gagcacgcgcg cggcggcggt ctctgagcgc ctctgctctc tctcccggtt tcagatccgc 60
 atttgctacc agcggcggcc gcgcggagcc aggcgggtcc tcagcgccca gcacggctcc 120
 cggcaacccg gagcgcgcac cgcagccggc ggccgagctc gcgcatccca gccatcactc 180

ttccacctgc tccttagaga agggaagatg agtgagtcga gctcgaagtc cagccagccc	240
ttggcctcca agcaggaaaa ggacggcact gagaagcggg gccggggcag gccgcgcaag	300
cagcctccgg tgagtcccg gacagcgctg gtagggagtc agaaggagcc cagcgaagtg	360
ccaacacctt agagacctcg gggccgacca aagggaagca aaaacaaggg tgctgccaag	420
acccggaaaa ccaccacaac tccaggaagg aaaccaaggg gcagacccaa aaaactggag	480
aaggaggaag aggagggcat ctgcgaggag tcctcggagg aggagcagt acccatgcgt	540
gccgcctget cctcactgga ggagcagctt ccttctggga ctggacagct ttgctccgct	600
cccaccgccc ccgccccttc ccaggccca ccatcaccac cgcctctggc cgccaccccc	660
atcttccacc tgtgccctca ccaccacact acacagcaca ccagccgctg caggggctcc	720
catgggcctg agtggggagc agttttcccc tggcctcagt tcacagctcc ccccgccac	780
cacgcatac acacatgccc tcctggacaa ggctaacatc ccacttagcc gcaccctgca	840
cctgctgcgt ccccaactccc ttgggtggtg ggacattgct ctctgggctt ttggtttggg	900
ggcgccctct ctgctccttc actgttcctt ctggcttccc atagtggggc ctgggagggg	960
tcccctggcc ttaaaagggg cccaagccat ctcatcctgg cacgccctac tccactgccc	1020
tggcacagca ggtgtggcca atggaggggg gtgctggccc ccaggattcc ccagccaaa	1080
ctgtctttgt caccacgtgg ggctcacttt tcatccttcc ccaacttccc tagtccccgt	1140
actaggttgg acagccccct tcggctacag gaaggcagga ggggtgagtc ccctactccc	1200
tcttcaactgt ggccacagcc cccttgccct ccgcctggga tctgagtaca tattgtggtg	1260
atggagatgc agtcacttat tgtccagggt aggcccaaga gccctgtggc cgcacctgag	1320
gtgggctggg gctgctcccc taaccctact ttcgttcgc cactcagcca tttccccctc	1380
cagatggg gcaccaataa caaggagtc accctgcccg ctccaaccc ccctcctgct	1440
cctccctgcc cccaaggtt ctgggttcca tttttcctct gttcaciaaac tacctctgga	1500
cagttgtgtt gttttttgtt caatgttcca ttcttcgaca tccgtcattg ctgctgctac	1560
cagcgccaaa tgttcatcct cattgcctcc tgttctgccc acgatccct ccccaagat	1620
actctttgtg ggaagagggg ctggggcatg gcaggctggg tgaccgacta cccagtccc	1680
agggaaggtg gccctgcccc taggatgctg cagcagagt agcaaggggg cccgaatcga	1740
ccataaaggg tgtaggggcc acctcctccc cctgttctgt tggggagggg tagccatgat	1800
ttgtcccagc ctggggctcc ctctctgggt tcctatttgc agttacttga ataaaaaaaa	1860
tatccttttc tgg	1873

<210> 32
 <211> 324
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```
atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc      60
actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aagcagcctc cggtagagtc cgggacagcg      120
ctggtaggga gtcagaagga gcccagcgaa gtgccaacac ctaagagacc tcggggccga      180
ccaaaggga gcaaaaacaa ggggtgtgcc aagaccggga aaaccaccac aactccagga      240
aggaaaccaa ggggcagacc caaaaaactg gagaaggagg aagaggagg catctcgcag      300
gagtcctcgg aggaggagca gtga                                             324
```

<210> 33

<211> 1875

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> NCIB Accession No. M23616

<400> 33

```
gctttttaag ctcccctgag ccggtgtgc gtcctctaa ttgggactcc gagccggggc      60
tatttctggg ctggcgcggc tccaagaaga tccgcatttg ctaccagcgg cggccgcgcg      120
gagccaggcc ggtcctcagc gccagcacg gtcctcggca acccggagcg cgcaccgcag      180
ccggcgggcc agctcgcgca tcccagccat cactcttcca cctgtcctt agagaaggga      240
agatgagtga gtcgagctcg aagtccagcc agcccttggc ctccaagcag gaaaaggacg      300
gcactgagaa gcggggcccg ggcaggccgc gcaagcagcc tccgaaggag ccagcgaa      360
tgccaacacc taagagacct cggggccgac caaagggaag caaaaacaag ggtgtgtcca      420
acccgga aaccaccaca actccaggaa ggaaaccaag ggcagaccc aaaaaactgg      480
agaaggagga agaggagggc atctcgcagg agtcctcgga ggaggagcag tgacctatgc      540
gtgcgcctg ctctcactg gaggagcagc ttccttcttg gactggacag ctttgtccg      600
ctcccaccgc ccccgcccct tcccaggcc caccatcacc accgcctctg gccgccacce      660
ccatcttcca cctgtgccct caccaccaca ctacacagca caccagccgc tgcaggggct      720
cccatgggcc tgagtgggga gcagttttcc cctggcctca gttcacagct ccccccgcgc      780
accacgcat acacacatgc ctcctggac aaggctaaca tcccacttag ccgcaccctg      840
cacctgtgc gtcccaactc ccttgggtgt ggggacattg ctctctgggc ttttggtttg      900
ggggcgccct ctctgtcct tcaactgttc ctctggcttc ccatagtggg gcctgggagg      960
gttcccctgg ccttaaaagg ggccaagcc atctcatcct ggcacgcct actccactgc      1020
cctggcacag caggtgtggc caatggaggg ggggtgtggc cccagatt ccccagcca      1080
```



```

aactgtcttt gtcaccacgt ggggctcact ttctatcctt ccccaacttc cctagtcccc 1140
gtactagggtt ggacagcccc ctccggctac aggaaggcag gaggggtgag tcccctactc 1200
cctcttcact gtggccacag cccccttgcc ctccgcctgg gatctgagta catattgtgg 1260
tgatggagat gcagtcactt attgtccagg tgaggcccaa gagccctgtg gccgcacctg 1320
aggtgggctg gggtgctcc cctaacccta ctttcgttcc gccactcagc catttcccc 1380
tcctcagatg gggcaccaat aacaaggagc tcacctgcc cgctcccaac cccctcctg 1440
ctcctccctg ccccccaagg ttctgggttc catttttctt ctgttcacaa actacctctg 1500
gacagttgtg ttgttttttg ttcaatgttc cattcttcga catccgtcat tgctgctgct 1560
accagegcca aatgttcata ctcatcgcct cctgttctgc ccacgatccc ctcccccaag 1620
atactctttg tgggaagagg ggctggggca tggcaggctg ggtgaccgac taccacagtc 1680
cagggaagg tggccctgcc cctaggatgc tgcagcagag tgagcaaggg ggcccgaatc 1740
gaccataaag ggtgtagggg ccacctctc cccctgttct gttggggagg ggtagccatg 1800
atctgtccca gcctggggct ccctctctgg ttctctatct gcagttactt gaataaaaaa 1860
aatatccttt tctgg 1875

```

```

<210> 34
<211> 291
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 34
atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc 60
actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aagcagcctc cgaaggagcc cagcgaagtg 120
ccaacacctt agagacctcg gggccgacca aagggaagca aaaacaaggg tgctgccaag 180
ccggaaaa ccaccacaac tccaggaagg aaaccaaggg gcagacccaa aaaactggag 240
aaggaggaag aggagggcat ctgcaggag tcctcggagg aggagcagtg a 291

```

```

<210> 35
<211> 4111
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 35
acacaccaca cacactcaca ctcacacaca ctcacacaca ctatccccct tgaatcttgg 60
ggcaggaact cagaaaactt ccagcccggg cagcgcgcgc ttggtgcaag actcaggagc 120
tagcagcccg tccccctccg actctccggg gccgcgctg cctgctcccg ccacctagg 180
aggcgcggtg ccaccacta ctctgtcttc tgccgtgtgt ccgtgcccga ccctatcccg 240
gcggagtctc cccatcctcc ttgtcttctc gactgcccga ggcactttca atctcaatct 300
cttctctctc tctctctctc tctctgtctc tctctctctc tctctctctc tctctctcgc 360

```

aggggtggggg gaagaggagg aggaattctt tccccgcta acatttcaag ggacacaatt 420
 cactccaagt ctcttccctt tccaagccgc ttccgaagtg ctcccgggtgc ccgcaactcc 480
 tgatcccaac ccgcgagagg agcctctgcg acctcaaagc ctctcttctt tctccctcgc 540
 ttcctctctc ctcttgctac ctccacctcc accgccacct ccacctccgg caccacacca 600
 ccgccgccgc cgccaccggc agcgctcct cctctcctcc tctcctccc ctcttctctt 660
 tttggcagcc gctggacgtc cgggtgtgat ggtggcagcg gcggcagcct aagcaacagc 720
 agccctcgca gcccgccagc tcgcgctcgc cccgccggcg tcccagccc tatcacctca 780
 tctcccgaaa ggtgctgggc agctccgggg cggtcgaggc gaagcggctg cagcggcggt 840
 agcggcgggc ggaggcagga tgagcgcacg cggtgagggc gcggggcagc cgtccacttc 900
 agcccagggg caacctgccg cccagcgcc tcagaagaga ggacgcggcc gcccaggaa 960
 cagcagcaa gaaccaaccg gtgagccctc tctaagaga cccaggggaa gacccaaagg 1020
 cagcaaaaac aagagtccct ctaaagcagc tcaaaagaaa gcagaagcca ctggagaaaa 1080
 acggccaaga ggcagacctt ggaaatggcc acaacaagtt gttcagaaga agcctgctca 1140
 ggaggaaact gaagagacat cctcacaaga gtctgccgaa gaggactagg gggcgcaacg 1200
 ttcgatttct acctcagcag cagttggatc ttttgaaggg agaagacact gcagtgacca 1260
 cttattctgt attgccatgg tctttccact ttcatctggg gtgggggtggg gtgggggtggg 1320
 ggaggggggg gtgggggtggg gagaaatcac ataaccttaa aaaggactat attaatacacc 1380
 ttctttgtaa tcccttcaca gtcccaggtt tagtgaaaaa ctgctgtaaa cacaggggac 1440
 acagcttaac aatgcaactt ttaattactg ttttctttt tcttaaccta ctaatagttt 1500
 gttgatctga taagcaagag tgggcgggtg agaaaaaccg aattgggttt agtcaatcac 1560
 cactgcat gcaacaaga aacgtgtcac acttgtagc tcgggcattc atataggaag 1620
 aacgcggtgt gtaacactgt gtacacctca aataccaccc caaccactc cctgtagtga 1680
 atcctctgtt tagaacacca aagataagga ctagatacta ctttctcttt ttcgtataat 1740
 cttgtagaca ctacttgat gatttttaac tttttatttc taaatgagac gaaatgctga 1800
 tgtatccttt cattcagcta acaactaga aaaggttatg ttcatttttc aaaaagggaa 1860
 gtaagcaaac aaatattgcc aactcttcta tttatggata tcacacatat cagcaggagt 1920
 aataaattta ctacagcac ttgttttcag gacaacactt cattttcagg aaatctactt 1980
 cctacagagc caaatgcc tttagcaata aataacactt gtcagcctca gagcatttaa 2040
 ggaaactaga caagtaaaat tatcctcttt gtaatttaat gaaaaggtag aacagaataa 2100
 tgcattgatga actcacctaa ttatgaggtg ggaggagcga aatctaaatt tcttttgcta 2160
 tagttataca tcaatttaaa aagcaaaaaa aaaaaggggg gggcaatctc tctctgtgtc 2220

tttctctctc tctctccctc tccctctctc ttttcatgtg tatcagtttc catgaaagac 2280
 ctgaatacca cttacctcaa attaagcata tgtgttactt caagtaatac gttttgacat 2340
 aagatgggtg accaagggtg ttttcttcgg cttgagttca ccatctcttc attcaaactg 2400
 cacttttagc cagagatgca atatatcccc actactcaat actacctctg aatgttataa 2460
 cgaatttaca gtctagtact tattacatgc tgctatacac aagcaatgca agaaaaaac 2520
 ttactgggta ggtgattcta atcatctgca gttctttttg tacacttaat tacagttaaa 2580
 gaagcaatct ccttactgtg tttcagcatg actatgtatt tttctatggt tttttaatta 2640
 aaaattttta aaatacttgt ttcagcttct ctgctagatt tctacattaa cttgaaaatt 2700
 ttttaaccaa gtcgctccta ggttcttaag gataattttc ctcaatcaca ctacacatca 2760
 cacaagattt gactgtaata tttaaatatt accctccaag tctgtacctc aaatgaattc 2820
 ttttaaggaga tggactaatt gacttgcaaa gacctacctc cagacttcaa aaggaatgaa 2880
 tttgttactt gcagcattca tttgtttttt caatgtttga aatagttcaa actgcagcta 2940
 accctagtca aaactatttt tgtaaaagac atttgataga aaggaacacg tttttacata 3000
 cttttgcaaa ataagtaaata aataaataaa ataaagccaa ccttcaaaga acttgaagct 3060
 ttgtaggtga gatgcaacaa gccctgcttt tgcataatgc aatcaaaaat atgtgttttt 3120
 aagattagtt gaatataaga aaatgcttga caaatatttt catgtatttt acacaaatgt 3180
 gatttttgta atatgtctca accagattta ttttaaacgc ttcttatgta gagtttttat 3240
 gcctttctct cctagtgagt gtgctgactt tttaacatgg tattatcaac tgggccagga 3300
 ggtagtttct catgacggct tttgtcagta tggcttttag tactgaagcc aaatgaaact 3360
 caaaaccatc tctcttcag ctgcttcagg gaggtagttt caaaggccac atacctctct 3420
 agactggca gatcgctcac tgttgtgaat caccaaagga gctatggaga gaattaaaac 3480
 caaacattac tgttaactgt gcgttaaata agcaaataaa cagtggctca taaaaataaa 3540
 agtcgcattc catatctttg gatgggcctt ttagaaacct cattggccag ctcataaaat 3600
 ggaagcaatt gtcatgttg gccaaacatg gtgcaccgag tgatttccat ctctggtaaa 3660
 gttacacttt tatttctgt atgttgtaaca atcaaaacac actactacct cttaagtccc 3720
 agtataacct atttttcata ctgaaaaaaa aagcttgttg ccaatggaac agtaagaaca 3780
 tcataaaaatt tttatatata tagtttattt ttgtgggaga taaattttat aggactgttc 3840
 tttgctgttg ttggctgcag ctacataaga ctggacattt aacttttcta ccatttctgc 3900
 aagttaggta tgtttgcagg agaaaagtat caagacgttt aactgcagtt gactttctcc 3960
 ctgttccttt gagtgtcttc taactttatt ctttgttctt tatgtagaat tgctgtctat 4020
 gattgtactt tgaatcgctt gcttgttgaa aatatttctc tagtgtatta tcaactgtctg 4080
 ttctgcacaa taaacataac agcctctgtg a 4111

<210> 36
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggc cacaacaagt tggtcagaag aagcctgctc aggaggaaac tgaagagaca 300
 tcctcacaag agtctgccga agaggactag 330

<210> 37
 <211> 252
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg ga 252

<210> 38
 <211> 273
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg aggagtttta cattgcagct tag 273

<210> 39
 <211> 291
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60

gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggagacct 240
 aggaaatggc ctactattgc actttgcaca cactggataa acatctgctg a 291

<210> 40
 <211> 1207
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> NCIB Accession No. NM_002128

<400> 40
 gagacagcgc cggggcaagt gagagccgga cgggcactgg gcgactctgt gcctcgctga 60
 ggaaaaataa ctaaacaatgg gcaaaggaga tcctaagaag ccgagaggca aaatgtcatc 120
 atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag aagaagcacc cagatgcttc 180
 agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctcaagagagg tggaagacca tgtctgctaa 240
 agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcgagacaag gcccgttatg aaagagaaat 300
 gaaaacctat atccctccca aaggggagac aaaaaagaag ttcaaggatc ccaatgcacc 360
 caagaggcct ccttcggcct tcttcctctt ctgctctgag tategcccaa aaatcaaagg 420
 agaacatcct ggctgtcca ttggtgatgt tgcaagaaa ctgggagaga tgtggaataa 480
 cactgctgca gatgacaagc agccttatga aaagaaggct gcgaagctga aggaaaaata 540
 cgaaaaggat attgctgcat atcgagctaa aggaaagcct gatgcagcaa aaaagggagt 600
 gtcaaggct gaaaaaagca agaaaaagaa ggaagaggag gaagatgagg aagatgaaga 660
 ggatgaggag gaggaggaag atgaagaaga tgaagatgaa gaagaagatg atgatgatga 720
 ataagttggt tctagcgcag ttttttttct ttgtctataa agcatttaac cccctgtac 780
 acaactcact ccttttaaaag aaaaaaattg aaatgtaagg ctgtgtaaga tttgttttta 840
 aactgtacag tgtctttttt tgtatagtta acacactacc gaatgtgtct ttagatagcc 900
 ctgtcctggg ggtattttca atagccacta accttgccctg gtacagtatg ggggttgtaa 960
 attggcatgg aaattttaaag caggttcttg ttggtgcaca gcacaaatta gttatatatg 1020
 gggatggtag ttttttcatc ttcagttgtc tctgatgcag cttatacgaa ataattgttg 1080
 ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg caaaaaaaaa aaaagttgca gctgttttgt 1140
 tgacattctg aatgcttcta agtaaataca atttttttta ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
 aaaaaaa 1207

<210> 41
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 atggggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaaatgt catcatatgc attttttgtg 60
 caaacttgtc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120
 ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180
 gaagatatgg caaaggcgga caaggcccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240
 cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg 300
 gccttcttcc tcttctgctc tgagtatcgc ccaaaaatca aaggagaaca tcttggcctg 360
 tccattggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataacactgc tgcagatgac 420
 agcagcctt atgaaaagaa ggctgccaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct 480
 gcatatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540
 agcaagaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600
 gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

<210> 42
 <211> 444
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 taaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg ctggagtgca gtggtacaat ctcggctcat tgcaacctcc acctcccagg 300
 ttcaagcaat tctcctgcct caggctcctg agtagttggg attacaggca cccaccacca 360
 caccagcta atttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg gccaggctgg 420
 tctcgaactc ctgacctcag gtga 444

<210> 43
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180

tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg acaatctact accaagaacc agctccaaga agaaaacatc tctgggaaac 300
 agtaccaaaa ggagtcactg a 321

<210> 44
 <211> 279
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggg gggtgctaata gaagagcccc tgctgggtga 279

<210> 45
 <211> 291
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggc cacaacaagt tggtcagaag aagcctgctc agtattcctg a 291

<210> 46
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggc cacaacaagt tggtcagaag aagcctgctc aggtcaatgt tgccttgcc 300
 gggaaggacc acccgggcaa tcttatatat ctactgttct ctaaaaatgc cacttag 357

<210> 47
 <211> 288

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggag cgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
 aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggactga 288

<210> 48
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 actgagaagc gggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 49
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 50
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa 36

<210> 51
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 actgagaagc gggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 52
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 53
 <211> 36
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa

36

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

cctcagaaga gaggacgcgg ccgccccagg aag

33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

ctcctaaga gaccagggg aagacccaa ggc

33

<210> 56

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

actggagaaa aacggccaag aggcagacct aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag

60

aag

63

<210> 57

<211> 234

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

ctaagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag

60

gagcataaga agaagcacc agatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc

120

tcagagaggt ggaaggtaag agggcttaaa acatgctaac aaggtaatta aaagacagtt

180

tccaattgag gatgcaaaaa aaagcctagt tggcattctc gtagtgggac gcta

234

<210> 58

<211> 213

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

ccgagaggca aaatgtcatc atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag

60

aagaagcacc cagatgcttc agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctcagagagg

120

tggaagacca tgtctgctaa agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcggacaag

180

gcccgttatg aaagagaaat gaaaacctat atc

213

<210> 59
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 cctaagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag 60
 gagcataaga agaagcacc cagatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc 120
 tcagagaggt ggaagacccat gtctgctaaa gagaaaggaa aatttgaaga tatggcaaag 180
 gcggacaagg cccgttatga aagagaaatg aaaacctat 219

<210> 60
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 cccaatgcac ccaagaggcc tccttcggcc ttcttctct tctgctctga gtatcgccca 60
 aaaatcaaag gagaacatcc tggcctgtcc attggtgatg ttgcgaagaa actgggagag 120
 atgtggaata aactgctgc agatgacaag cagccttatg aaaagaaggc tgcgaagctg 180
 aaggaaaaat acgaaaagga tattgctgca tatcgagcta aagga 225

<210> 61
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 cccaagaggc ctccttcggc cttcttctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60
 gagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120
 aactgctg cagatgacaa gcagccttat gaaaagaagg ctgcgaagct gaaggaaaaa 180
 tacgaaaagg atattgctgc atatcga 207

<210> 62
 <211> 147
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 cccaagaggc ctccttcggc cttcttctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60
 ggagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120
 aactgctg cagatgacaa gcagcct 147

<210> 63
 <211> 546
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

gaggagcata agaagaagaa cccagatgct tcagtcaagt tctcagagtt tttaaagaag	60
tgctcagaga catggaagac cattttttgct aaagagaaag gaaaatttga agatatggca	120
aaggcggaca aggcccata tgaaagagaa atgaaaacct atatccctcc taaaggggag	180
aaaaaaaaaga agttcaagga tcccaatgca cccaagaggc ctcctttggc ctttttcctg	240
ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa ggagaacatc ctggcctgtc cattgatgat	300
gttgtgaaga aactggcagg gatgtggaat aacaccgctg cagctgacaa gcagttttat	360
gaaaagaagg ctgcaaagct gaaggaaaaa tacaaaaagg atattgctgc atatcgagct	420
aaaggaaagc ctaattcagc aaaaaagaga gttgtcaagg ctgaaaaaag caagaaaaag	480
aaggaagagg aagaagatga agaggatgaa caagaggagg aaaatgaaga agatgatgat	540
aataa	546

<210> 64

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc	60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc	120
ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc	180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct	240
aggaaatgga atactctgga gcagtgcaat gtgtgttcca agcccatcat ggagcggatt	300
ccgagcca ccgggaaggc ctatcatcct cactgtttca cctgcgtgat gtgccaccgc	360
agcctggatg ggatcccatt cactgtggat gctggcgggc tcattcactg cattgaggac	420
ttccacaaga aatttgcccc gcggtgttct gtgtgcaagg agcctattat gccagccccg	480
ggccaggagg agactgtccg tattgtggct ttggatcgag atttccatgt tcaactgtac	540
cgatgcgagg attgcggtgg tctcctgtct gaaggagata accaaggctg ctacccttg	600
gatgggcaca tcctctgcaa gacctgcaac tctgcccgca tcagggtgtt gaccgccaag	660
gcgagcactg acctttag	678

HMGB1-Konzentrationen

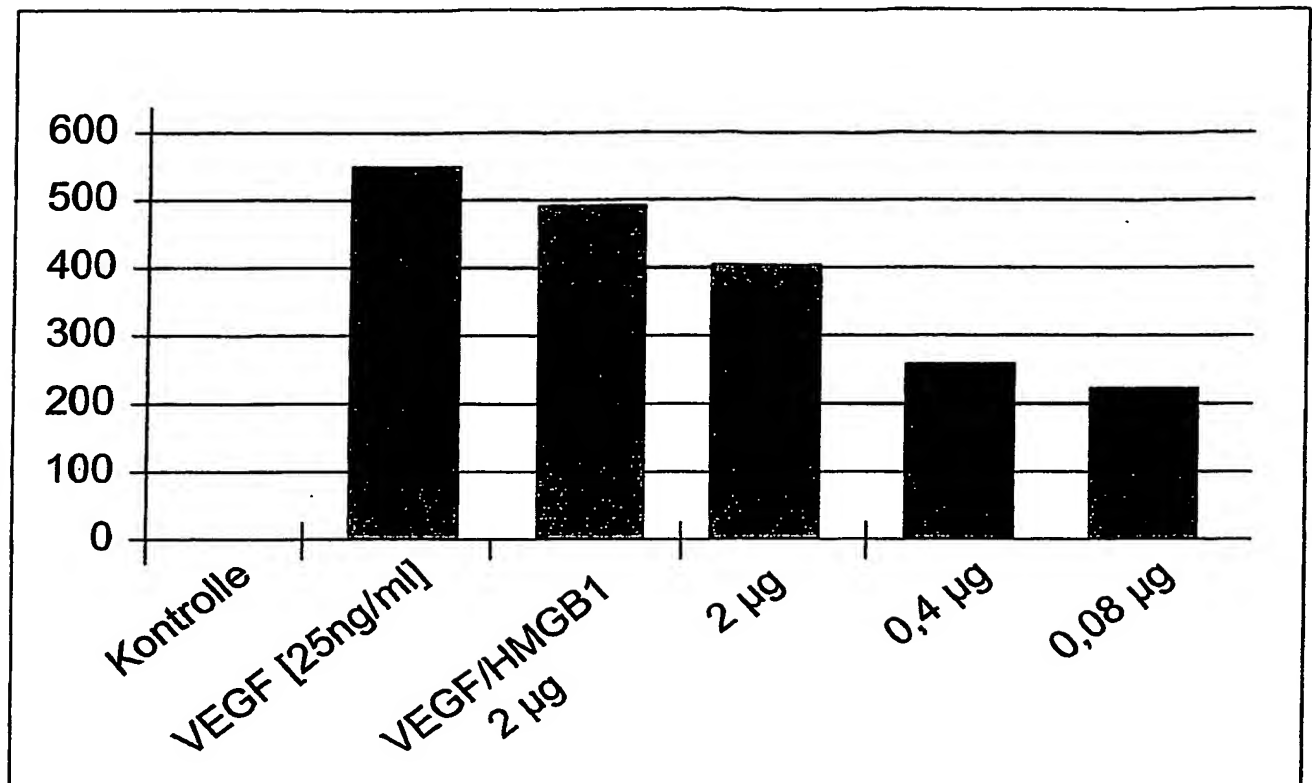


Fig. 1

HMGA1-Konzentrationen

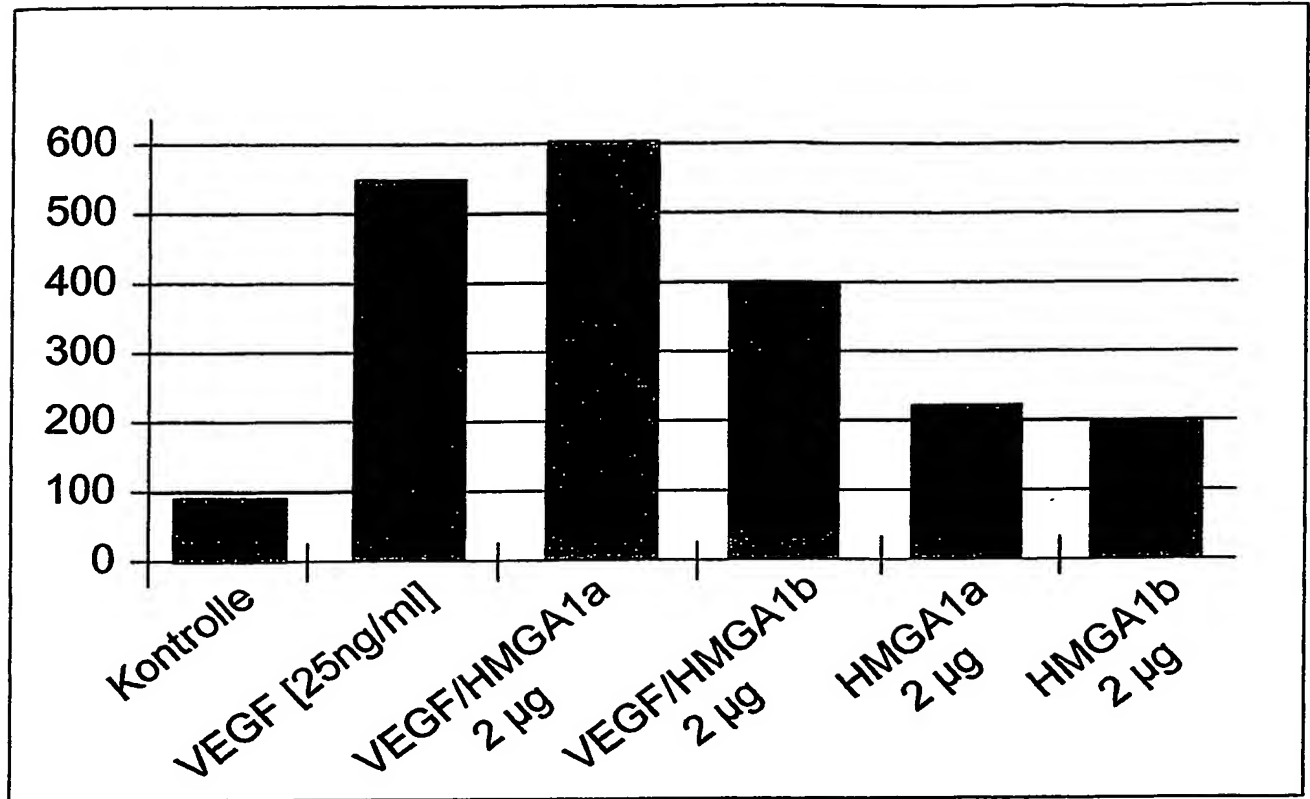


Fig. 2

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**